

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München
Direktor: Professor Dr. N. Zöllner

**Zur Vereinfachung und Beschleunigung des
Analysenganges der Standardfibrinpapier-Lysebestimmung**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Wolfgang Thym
aus
Tübingen

München 1979

1980



Digitized by the Internet Archive
in 2026

AUS DER MEDIZINISCHEN POLIKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
DIREKTOR: PROFESSOR DR. N. ZÖLLNER

ZUR VEREINFACHUNG UND BESCHLEUNIGUNG DES ANALYSENGANGES
DER STANDARDFIBRINPAPIER-LYSEBESTIMMUNG

INAUGURAL - DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE IN DER GESAMTEN MEDIZIN
AN DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN

VORGELEGT VON
WOLFGANG THYM
AUS
TÜBINGEN

MÜNCHEN 1979

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität
München

Berichterstatter: Professor Dr. N. Goossens

Mitberichterstatter: Professor Dr. N. Zöllner

Dekan: Professor Dr. W. Spann

Tag der mündlichen
Prüfung:

31. Januar 1980



Mein Dank gilt:

Herrn Professor Dr. N. Goossens, der die Schirmherrschaft dieser Arbeit übernommen hat. Seine stete, freundliche Bereitschaft zu Anregung und Kritik war mir eine wertvolle Hilfe.

Herrn Dr. H. Rath, der diese Arbeit von der Ausarbeitung des Versuchsprogrammes bis hin zur schriftlichen Abfassung mit großem Engagement betreute

und Herrn Ch. Thieme, der bei der mathematisch-statistischen Beurteilung der Ergebnisse wesentliche Anregungen gab.

Einige Gedanken

über die

I. Einleitung

1. Die Bedeutung der
2. Die Bedeutung der
3. Die Bedeutung der

II. Hauptteil

1. Die Bedeutung der
2. Die Bedeutung der
3. Die Bedeutung der
4. Die Bedeutung der

III. Schluss

1. Die Bedeutung der
2. Die Bedeutung der
3. Die Bedeutung der
4. Die Bedeutung der
5. Die Bedeutung der
6. Die Bedeutung der
7. Die Bedeutung der
8. Die Bedeutung der
9. Die Bedeutung der
10. Die Bedeutung der

MEINEN ELTERN

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

Seite

Theoretischer Teil

I. EINLEITUNG	1
1. Ziel der Arbeit	1
2. Prinzip der Originalmethode	1
3. Präzisierung des Arbeitsziels	3
II. PHYSIOLOGIE DER FIBRINOLYSE	
1. Definition und physiologische Funktion	4
2. Wirkungsmechanismus	4
a) Aktivatoren	5
b) Inhibitoren	8
III. NACHWEISMETHODEN DER FIBRINOLYSE	
1. Messung der Fibrin-/Fibrinogenspaltprodukte	
a) sog. Fibrinpolymerisationszeiten	11
b) Staphylokokken-Clumping-Test	12
2. Lysezeitbestimmungen	
a) Spontanlysetest	13
b) Plasma-Lysetest	13
c) Euglobulinlyse-Test	13
d) Clot-Lysis-Time	14
3. Lysebestimmung mit standardisiertem Fibrinsubstrat	
a) Fibrinplattenmethode	14
b) "Glasröhrchenmethode"	15
4. Thrombelastographie	15

Experimenteller Teil

I. VERWENDETE MATERIALIEN UND GERÄTE	17
II. VERSUCHSPROGRAMM	19
III. VERSUCHSDURCHFÜHRUNG	
1. a) Vorbereitung	21
b) Blutentnahme	22
c) Herstellung der Plasma-Pools	22
d) Ansatz der Aktivierungs- und Verdünnungs- testung, Teilansatz der Zeittestung	23
e) Ansatz der Temperaturtestung	24
f) Restansatz der Zeittestung	25
g) Beendigung der Inkubation	27
h) "Automatik"-Arbeitsgang	27
i) Trocknung	30
k) Eluation	30
l) Photometrische Auswertung	31
2. Synopse des Versuchsablaufs	31
3. Errechnung der Lysequoten	33
4. Fehlerquellen	
a) Bekannte Fehlerquellen	33
b) Mögliche zusätzliche Fehlerquelle	34
5. Nachversuch	35
6. Statistische Auswertung	36

	Seite
IV. ERGEBNISSE	39
1. Zeittestung	39
2. Temperaturtestung	43
3. Verdünnungstestung	44
4. Aktivierungstestung	45
5. Blutfette - Fibrinolyse	48
6. Nachversuch	49
7. Zur Maßeinheit der lytischen Aktivität	52
V. DISKUSSION	
A 1. Zeittestung	55
2. Temperaturtestung	56
3. Verdünnungstestung	56
4. Aktivierungstestung	57
5. Blutfette - Fibrinolyse	57
6. Nachversuch	58
B Problem der Normwertschwankungen	58
C Schlußfolgerungen	61
VI. ZUSAMMENFASSUNG	65
VII. LITERATURVERZEICHNIS	67

THEORETISCHER TEIL

I. EINLEITUNG

Die Standardfibrinpapier-Lysebestimmung nach Goossens (SFPL) zählt zu den wenigen Labormethoden, die fibrinolytische Prozesse in vivo und in vitro quantitativ erfassen können. Seit der Erstveröffentlichung der Methode (Goossens und Walcher, 19) befaßten sich zahlreiche Autoren mit diesem Verfahren. Dies führte teils zur Weiterentwicklung und Standardisierung der SFPL (Sipos, 59, Goossens, 21, Schorer, 62, Metze und Linke, 49, Beitinger, 8, Weber, 68, Buchheim, 12, Rath, 56), teils zu praktischer Nutzenanwendung der Methode:

Untersuchungen über den Einfluß bestimmter Pharmaka auf das fibrinolytische System (Goossens, 20, Rath, 56, Schorer, 62, Lerch, 43) und

Überwachung der fibrinolytischen Aktivität unter Urokinase- bzw. Streptokinasetherapie (Sipos, 59).

Als Routinemethode konnte sich die SFPL jedoch nicht durchsetzen. Dem standen bisher bestimmte Eigenheiten des Verfahrens im Wege, die unten näher beschrieben werden.

1. Ziel der Arbeit

Mit dieser Arbeit soll untersucht werden, ob sich die Originalmethode der SFPL (siehe unten) so modifizieren läßt, daß sie "laborfreundlicher" wird.

Zur besseren Erläuterung sei zunächst das Prinzip der Originalmethode vorgestellt:

2. Prinzip der Originalmethode der SFPL

Chromatographiepapier wird in einer Lösung getränkt, die eine genau definierte Menge von Rinder- oder Humanfibrinogen enthält. Mit Hilfe von Thrombin induziert man in dieser Lösung die Bildung von Fibrin, das sich gleichmäßig und vollständig an das Chromatographiepapier anlagert.

Damit liegt das sog. Standardfibrinpapier (SFP) vor, das aber auch bereits fertig im genormten Format bezogen werden kann (Fa. Macherey-Nagel & Co., Düren).

Einen SFP-Streifen inkubiert man nun 20 Std. lang bei 37° C in der Testlösung (meist Citratplasma, 1 : 5), deren fibrinolytisches Potential gemessen werden soll. Unter gleichen Bedingungen inkubiert man einen weiteren SFP-Streifen in einer Portion der Testlösung, in der jegliche fibrinolytische Aktivität "gestoppt" ist (Stoppen durch Fibrinolyseinhibitoren wie Trasylol^R, AMCHA oder Gumbix^R = PAMBA).

Nach der Inkubationszeit ist - abhängig vom Ausmaß des fibrinolytischen Potentials in der Testlösung - nur noch ein Restfibrinbelag auf dem SFP vorhanden, das in der Testlösung inkubiert war. Auf dem SFP aus der gestoppten Testlösung = Normlösung bleibt der ursprüngliche Fibrinbelag erhalten.

Man erfaßt diese unterschiedlichen Fibrinmengen, indem man die Papiere wie bei der Elektrophorese weiterbehandelt, d. h. mit Wässerung, Anfärbung und teilweiser Wiederentfärbung.

Die Farbstoffmenge, die nach diesem Arbeitsgang noch auf den Papieren verblieben ist, zählt als Maß für den Protein- (= Fibrin-) Belag auf diesen Papieren.

Die abschließende Eluation der SFP's gestattet nun über die photometrische Auswertung der Eluationsflüssigkeiten eine quantitative Beurteilung der Fibrinolyse in der Testlösung.

Der größte Nachteil der SFPL liegt demnach in der langen Inkubationsdauer von 20 Stunden. Abgesehen davon, daß sie dem Arbeitsrhythmus im Gerinnungslabor sehr häufig zuwiderläuft, ist es für zahlreiche klinische Fragestellungen wichtig, daß das Ergebnis so rasch wie möglich vorliegt.

Daneben stört aber auch die vorgeschriebene Inkubationstemperatur von 37° C, da in vielen Labors nur ein Inkubationsschrank vorhanden ist, der durch die SFPL eventuell blockiert wird.

Außerdem ist es unpraktisch, allein für die SFPL Citratblut im Verhältnis 1 : 5 abzunehmen, während alle anderen Routinemethoden im Gerinnungslabor die 1 : 10-Verdünnung erfordern.

3. Präzisierung des Arbeitsziels

Unsere Aufgabe ist es deshalb, bei der SFPL folgenden Fragen nachzugehen:

- a) Ist eine Verkürzung der Inkubationsdauer möglich?
- b) Kann man auch bei Raumtemperatur inkubieren?
- c) Genügt die im Gerinnungslabor übliche Citratblutverdünnung von 1 : 10?

Zusätzliche Fragestellungen:

Aus früheren Versuchen mit der SFPL ist bekannt (Goossens, 22), daß die fibrinolytische Aktivität im Testplasma mit mehr als 90 bis 100 Einheiten Streptokinase kaum noch zu steigern ist, teilweise fällt sie sogar wieder ab.

Wir untersuchen deshalb zusätzlich Testplasma nach Aktivierung mit 10, 50 und 100 Einheiten Streptokinase. Die Frage ist, ob zwischen der Aktivierung mit 50 und der mit 100 Einheiten Streptokinase ein signifikanter Unterschied besteht.

Darüber hinaus lassen wir bei allen Versuchspersonen die Serumspiegel von Cholesterin und Triglyceriden bestimmen und setzen sie mit der jeweiligen fibrinolytischen Aktivität in Beziehung, die nach der Originalmethode ermittelt wird.

II. PHYSIOLOGIE DER FIBRINOLYSE

1. Definition und physiologische Funktion

Fibrinolyse bedeutet die enzymatische Wiederauflösung von Fibringerinnseln im Organismus oder in vitro die Auflösung von Fibrin.

Beispiele für Fibrinolyse im Organismus sind die Gerinnselauflösung im Rahmen der Blutgerinnung (Fibrinolyse → Thrombolysse), die Gerinnselauflösung bei exsudativen Prozessen (Lobärpneumonie, fibrinös-eitrige Tracheobronchitis) oder die Wiederauflösung von Fibrinstrukturen, die Fibroblasten des Granulationsgewebes als Leitbahnen dienen.

Auch in Flüssigkeiten wie Urin, Pankreassekret und Tränenflüssigkeit spielt Fibrinolyse eine Rolle. Hier verhindert sie, daß Fibringerinnsel die zugehörigen Ableitungssysteme verlegen. Copley (15) zeigte, daß fibrinolytische Vorgänge außerdem bei der Regulation der Kapillarpermeabilität beteiligt sind. Die wechselseitige Bildung und Wiederauflösung einer Fibrinauskleidung soll dort den Stoffaustausch beeinflussen.

2. Wirkungsmechanismus

Die fibrinolytische Aktivität ist an Plasmin gebunden (im anglo-amerikanischen Sprachraum als Fibrinolysin bezeichnet). Plasmin gehört zu den proteolytischen Enzymen, die nicht streng substratspezifisch sind. Neben Fibrin (und Fibrinogen) greift es auch die Gerinnungsfaktoren V und VIII, Proteohormone wie z. B. ACTH und STH, bestimmte Komponenten des Komplements und wahrscheinlich auch noch andere Serumproteine an (Rasche und Hiemeyer, 55).

Trotzdem ist die physiologische Bedeutung des Plasmins im Bereich der Blutgerinnung am größten. Dies liegt daran, daß sich seine inaktive Vorstufe Plasminogen (Profibrinolysin) selektiv an Fibrin adsorbiert (Koller, 40). Nach der Aktivierung ist Fibrin somit nicht das einzige, aber doch das "nächstbeste" Substrat. Es wird durch Plasmin zu sog. Fibrin/Fibrinogen-Spaltprodukten: X, Y, D und E hydrolysiert. Sie sind frühestens dreißig Minuten nach Beginn der (in vitro-) Proteolyse nachweisbar und haben einen gerinnungshemmenden Effekt (Wiit, 71).

Fibrinbildung und Fibrinolyse befinden sich in einem fein abgestimmten physiologischen Gleichgewicht. Kleinste Schwankungen auf der einen Seite rufen sofort Gegenregulationen auf der anderen Seite hervor.

Im einzelnen beruht diese Balance auf einem sehr komplexen Ineinandergreifen aktivierender und inhibierender Mechanismen. Für die fibrinolytische Seite sei ein Überblick über aktivierende und hemmende Faktoren gegeben.

a) A k t i v a t o r e n der Fibrinolyse

Die Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin kann prinzipiell von zwei Seiten her angestoßen werden: durch einen Gewebe-Aktivator und einen Blut-Aktivator.

Der Gewebe-Aktivator kommt in einem ganz bestimmten Verteilungsmuster im menschlichen Organismus vor. Einen hohen Gehalt weisen Prostata, Uterus, Lunge, Ovarien und Schilddrüse auf. (Hierdurch erklärt sich auch die Gefahr von hyperfibrinolytischen Blutungen bei Eingriffen in diesen Bereichen.)

Daneben ist der Aktivator auch in Erythrozyten, Leukozyten Thrombozyten nachgewiesen (hämorrhagische Diathesen bei chronischen Myelosen!).

Geringere Konzentrationen finden sich in quergestreifter Muskulatur, Herzmuskel, Testes und Milz. Nahezu aktivatorfrei sind Leber und Aorta (Albrechtsen, 1, Witte 72).

Der Gewebe-Aktivator ist an zelluläre Proteine gebunden und gelangt über einen noch ungeklärten Mechanismus ins Blut (Witt, 71). Er ähnelt in vielen Punkten der aus menschlichem Harn extrahierbaren Urokinase. Da Urokinase weder toxisch noch antigen wirkt (i. Ggs. zu Streptokinase), ist sie ein wertvolles Mittel bei der fibrinolytischen Behandlung thromboembolischer Erkrankungen (Hess, Goossens u. Frost, 34). Einziger Nachteil sind ihre noch hohen Kosten.

Urokinase und Gewebe-Aktivator sind beide biochemisch relativ stabil. Sie aktivieren Plasminogen ohne Zwischenstufen direkt zu Plasmin.

Der Blut-Aktivator ist labil (Witt, 71). Normalerweise kommt er nur in geringen Mengen frei im Blut vor. In großer Menge zirkuliert jedoch sein stabiler Proaktivator, der fest auf der Oberfläche der Thrombozyten adsorbiert ist (Deutsch, 16). Er kann spontan (Gross, 25, Stamm, 64), durch sog. Blut/Serum-Lysokinasen (Astrup u. Sterndorf, 7) oder unphysiologisch/bakteriell durch Strepto- und Staphylokinase zum Aktivator umgewandelt werden.

Das System der Blut/Serum-Lysokinasen scheint dabei die wichtigste Rolle zu spielen. Hier ergibt sich auch ein interessanter Einblick in die Gleichgewichtsregulation von Fibrinbildung und Fibrinolyse:

Der Faktor XII der Blutgerinnung (Hagemann-Faktor) initiiert nach Kontakt mit unphysiologischen Oberflächen einerseits die enzymatische Kettenreaktion, die schließlich Fibrin entstehen läßt.

Andererseits aktiviert er aber auch Plasminogen (Heimburger, 31) direkt über dessen Proaktivator und indirekt über die Mobilmachung von Proteasen, wie Kallikrein, die ihrerseits Plasminogen über den Proaktivator erreichen.

Man sieht also, daß dieser Mechanismus Fibrinbildung und Fibrinolyse gleichzeitig in Gang setzt.

Verschiedene Autoren (Kline u. Fisman, 39, Kline, 38, Müllertz, 51, Sherry, 58, Spöttl u. Constantini, 60) kommen durch ihre Untersuchungen zu dem Schluß, daß Proaktivator- und Plasminogeneigenschaften an verschiedenen Stellen ein und desselben Moleküls lokalisiert sind. Dieses Proaktivator-Plasminogen-Molekül stellt nach Heimburger und Schwick (32) auch den Reaktionspartner für Streptokinase dar.

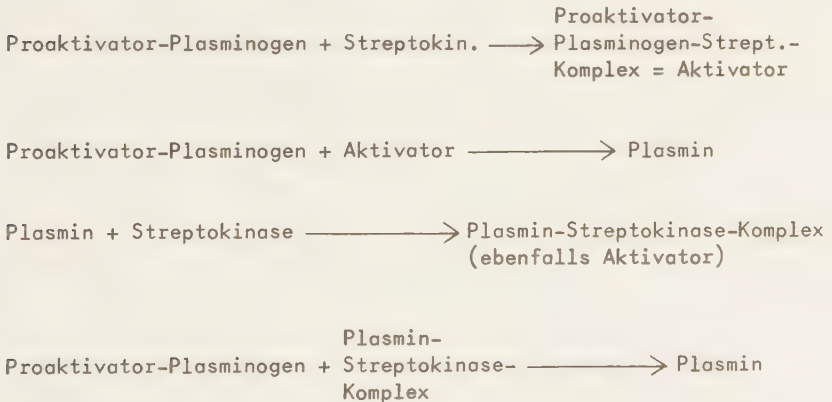
Streptokinase ist das in der Klinik am häufigsten verwendete Thrombolytikum. Als Stoffwechselprodukt Beta-hämolisierender Streptokokken kommt es normalerweise nicht im menschlichen Organismus vor. Nachzuweisen sind dagegen bei fast allen Erwachsenen Antistreptokinase und Antistreptolysin, die als Antikörper (nach früheren Streptok.-Infektionen) in sehr variablen Titern auftreten. Über ihre klinische Bedeutung und Probleme der Indikationsstellung bzw. Überwachung einer thrombolytischen Therapie mit Streptokinase ist an anderer Stelle ausführlich berichtet worden (Jaenecke, 35, Hess, Goossens u. Frost, 34, van de Loo, 45).

Der Mechanismus, über den Streptokinase in die Fibrinolyse ein- greift, ist zweistufig:

Der obengenannte (Blut-) Proaktivator-Plasminogen-Komplex ver- bindet sich im Verhältnis 1 : 1 mit Streptokinase-Molekülen zum Proaktivator-Plasminogen-Streptokinase-Komplex. Er ist der eigentliche Aktivator und wandelt nach dem gleichen Mechanismus wie körpereigene Aktivatoren im zweiten Schritt Plasminogen in Plasmin um (Blatt et al., 9).

Streptokinase kann sich aber auch direkt an Plasmin zu einem Plasmin-Streptokinase-Komplex anlagern. Er ist als Aktivator ebenso potent wie der obengenannte Molekülkomplex. Die fibrino- lytische Aktivität des Plasmins geht dabei jedoch verloren.

Das folgende Schema soll diese vielschichtigen Zusammenhänge verdeutlichen (modifiziert nach Beitinger, 8):



Weitere Aktivatoren:

Neben den bisher beschriebenen Mechanismen gibt es aber noch eine Reihe von Faktoren, die Fibrinolyse zu steigern vermögen. Beispiele hierfür sind: Schock, Stress, Allergene und Pyrogene (Vinazzer, 66). Auf welche Weise die Fibrinolyse hier im einzel- nen aktiviert wird, ist noch nicht genau geklärt. Dies gilt auch für die Fibrinolyse-induzierenden Wirkungen einzelner Pharmaka, wie Heparin und Heparinoide, Nikotinsäure (Heimbürger, 29) und Sulfonylharnstoffe. Klinische Bedeutung haben diese Substanzen aber im Zusammenhang mit Fibrinolyse nicht erlangt.

b) H e m m k ö r p e r der Fibrinolyse

Wie bei den aktivierenden Prinzipien lassen sich auch bei den Inhibitoren zwei Gruppen unterscheiden:

die sog. Antiplasmin, die bereits aktiviertes Plasmin hemmen und

die sog. Antiaktivatoren, die verhindern, daß Plasminogen überhaupt zu Plasmin umgewandelt wird.

Im Blut sind bisher die folgenden Antiplasmin nachgewiesen:

α_1 -Antitrypsin, Antithrombin III, C1-Inaktivator und α_2 -Makroglobulin (Heimburger, 30). Collen et al. (14), Moroi et al. (50) und Müllertz et al. (52) entdeckten vor kurzem einen weiteren derartigen Hemmkörper, den sie provisorisch Antiplasmin nannten (syn.: α_2 -plasmin-inhibitor oder primary plasmin inhibitor).

Heimburger und Schwick unterteilen die Antiplasmin im Blut nach ihrer Reaktionsgeschwindigkeit gegenüber Plasmin in Progressiv-inhibitor und Antiplasmin vom Soforttyp. Der Progressivinhibitor α_1 -Antitrypsin hemmt Plasmin irreversibel (Schwick, Heimburger, 63), α_2 -Makroglobulin und Antithrombin III bilden dagegen als Sofortinhibitoren dissoziabile Komplexe (Ambrus et al., 3, Ambrus u. Markus, 4), die Plasmin bei Berührung mit Fibrin wieder freigeben können.

Neben der Antiplasminwirkung haben die genannten Proteinase-Inhibitoren aber noch zahlreiche andere Funktionen:

α_2 -Makroglobulin und Antithrombin III wirken z. B. gleichzeitig als Progressivantithrombin (Jaenecke, 35) im fibrinbildenden System. Dies erlaubt, an einem weiteren Beispiel zu zeigen, wie eng Fibrinbildung und Fibrinolyse verzahnt sind:

Bei gesteigerter Thrombinaktivierung mit Fibrinbildung werden Antithrombin III und α_2 -Makroglobulin zum Teil als Hemmkörper dieses Systems verbraucht. Sie stehen damit nicht mehr als Antiplasmin zur Verfügung. Ein Teil des Plasmins kann jetzt - von Hemmkörpern unbehelligt - fibrinolytisch aktiv werden.

Ein weiterer Inhibitor vom Antiplasmintyp ist aus Gewebsextrakten von Pankreas (Kunitz und Northrop, 41), Rinderlunge (Astrup u. Stage, 5), Milz, Leber und Parotis isoliert worden.

In diese Kategorie gehört z. B. Trasylol^R, das neben Plasmin auch Chymotrypsin, Trypsin und Plasma- und Gewebs-Kallikrein inhibiert. Dies erklärt den zusätzlichen Antiaktivator-Effekt, auf den Markwardt verweist (46).

Daß es daneben aber noch eigenständige, physiologische Antiaktivatoren gibt, vermuteten eine ganze Reihe von Autoren seit langem. Der tatsächliche Nachweis gelang Hedner (28) aber erst vor relativ kurzer Zeit. Sie fand ein extrem instabiles α_2 -Globulin, das in besonders hoher Konzentration bei Patienten mit akuter Urämie nach Nierentransplantation anzutreffen ist (Heimbürger, 30).

Die bereits erwähnte Antistreptokinase gehört als quasi-physiologische Substanz ebenfalls zu den Antiaktivatoren.

Praktische, therapeutische Bedeutung hat die letzte Gruppe der Antiaktivatoren erlangt: die synthetischen Antifibrinolytika. Dazu rechnen Epsilon-Aminocapronsäure (EACA), para-Aminomethylbenzoesäure (PAMBA) und deren hydrierte Form, Aminomethylcyclohexancarbonsäure (AMCHA).

Da wir bei unseren Versuchen Gumbix^R = PAMBA zur Fibrinolysehemmung benutzten, gehen wir näher auf den Wirkungsmechanismus von PAMBA ein. Daraus ergeben sich wichtige Aspekte zur Interpretation der Versuchsergebnisse.

Substanzen vom Typ der EACA sind in vivo potente Antifibrinolytika (Okamoto, 53). PAMBA und AMCHA übertreffen dabei noch die Wirkung von EACA (Lohmann, Markwardt u. Landmann, 44).

Der antifibrinolytische Effekt von Gumbix^R soll auf einer Antiaktivator- und einer Antiplasminwirkung beruhen. Diese Hypothese wird vom Hersteller in der wissenschaftlichen Kurzinformation zu Gumbix^R verbreitet (36).

Von Philipp (54) wurden wir jedoch darauf hingewiesen, daß seit kurzem andere Erkenntnisse über den Wirkungsmechanismus der synthetischen Antifibrinolytika vorliegen.

Danach verhindern diese Substanzen, daß sich Plasminogen an Fibrin, sein wichtigstes Substrat, anlagert und dort aktiv werden kann. Nicht verhindert wird jedoch, daß sich freies Plasmin bildet. Bei bestimmten Konzentrationen wird dieser Prozeß sogar beschleunigt (Claeys u. Vermeylen, 13, Thorsen, Kok u. Astrup, 65, Wallén u. Wiman, 67).

Auf diese *in vitro* gewonnenen Ergebnisse werden wir in der Diskussion zurückkommen.

Abb. 1 gibt abschließend einen Überblick über das fibrinolytische Enzymsystem (modifiziert nach Rasche u. Hiemeyer, 55):

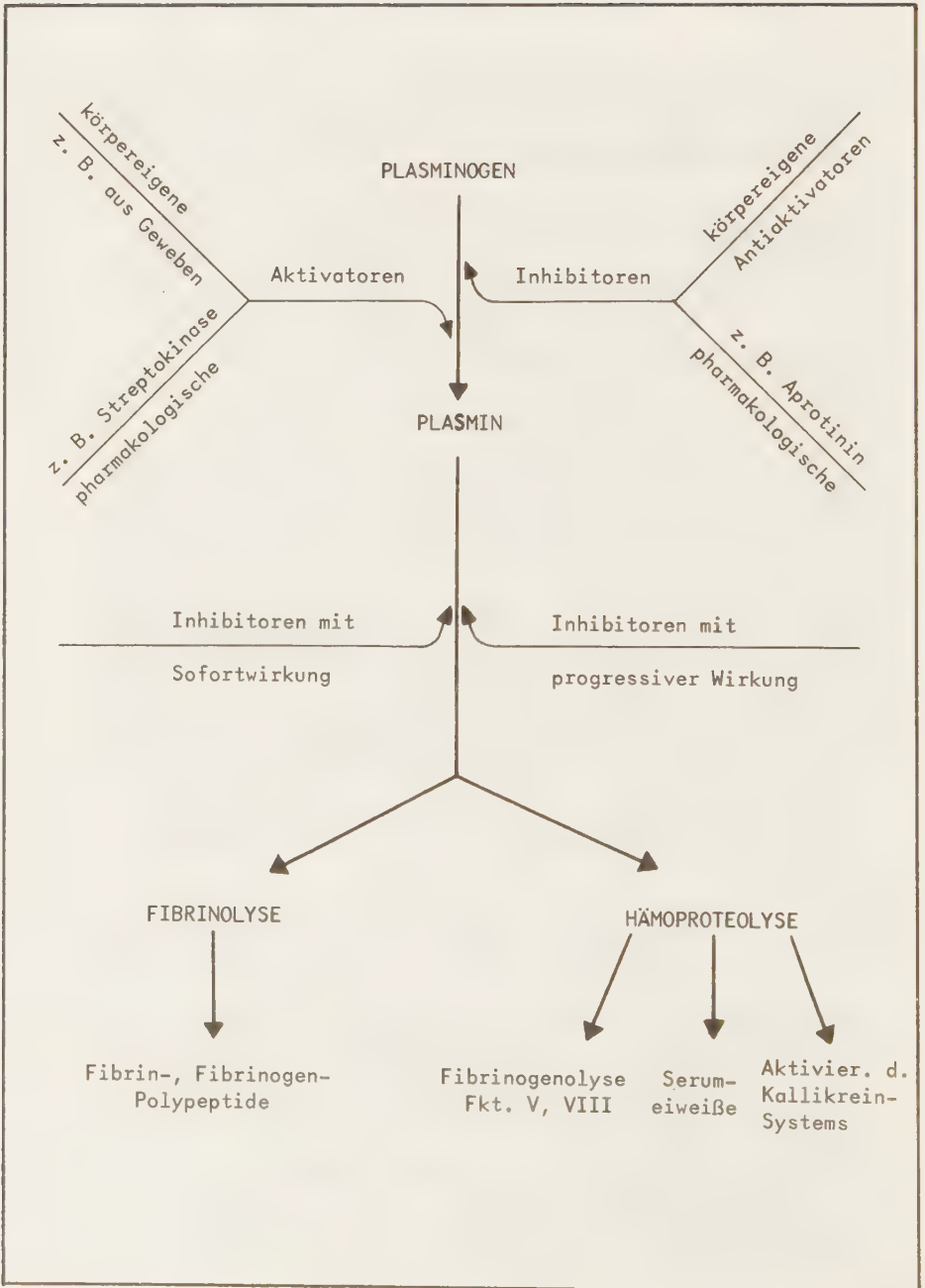


Abb. 1

III. NACHWEISMETHODEN DER FIBRINOLYSE

Zur Bestimmung der einzelnen Fibrinolyse-Komponenten sind zahlreiche Tests vorgeschlagen worden. Die meisten müssen jedoch wegen ihrer sehr komplexen Methodik hochspezialisierten Laboratorien vorbehalten bleiben.

Für die klinischen Belange (Überwachung und Steuerung einer Fibrinolyse-Therapie, Abklärung hämorrhagischer Diathesen) ist aber ein praktikables Verfahren wichtig. Es sollte präzise und reproduzierbar messen, möglichst viele Komponenten der Fibrinolyse erfassen können und zugleich die Verhältnisse in vivo weitgehend widerspiegeln.

Neben unserer Methode (s. S. 1) versucht man mit folgenden Tests dieses Problem zu lösen:

1. Messung der Fibrin-Fibrinogenspaltprodukte (FSP)

- a) Sog. Fibrinpolymerisationszeiten (Thrombinkoagulase-, Reptilase- und Thrombin-Gerinnungszeit, Wenzel et al., 69)

Prinzip: Thrombinkoagulase und Reptilase spalten von Fibrinogen, ähnlich wie biologisches Thrombin, Peptide ab. Es entstehen Fibrin-Monomere, die polymerisieren und zu einem sichtbaren Gerinnsel aggregieren. Ein pathologischer Spiegel von Fibrin(ogen)-Spaltprodukten im Blut verzögert diese Gerinnungsphase, da die Spaltprodukte mit den Fibrinmonomeren lösliche Komplexe bilden. Das Ausmaß der Gerinnungsverzögerung erlaubt es, auf den Plasmaspiegel der Spaltprodukte zu schließen

Die drei Tests erfassen die FSP's X, Y, D und E unterschiedlich präzise. Gegenüber Störfaktoren sind sie ebenfalls unterschiedlich empfindlich; nach Möglichkeit sollen deshalb die Ergebnisse aus mindestens 2 verschiedenen Tests gleichzeitig beurteilt werden.

Außerdem ist es empfehlenswert, die Fibrinogenkonzentration mitzubestimmen (Wenzel et al., 69), da zwischen FSP-Aktivität und Fibrinogenkonzentration eine systematische Wechselbeziehung besteht.

Aber auch mit dieser Kombination läßt sich noch nicht differenzieren, wodurch die Fibrinpolymerisationsphase gestört ist, ob FSP's vorliegen oder z. B. ein abnormes Fibrinogen (natales Fibrinogen, Dysfibrinogenämie) die Ursache ist. Wenzel et al. empfehlen deshalb, die Aussagekraft dieser Methoden nicht zu überfordern, sondern sie als einfache Suchmethoden einzusetzen (69).

b) Staphylokokken-Clumping-Test (Boehringer, 10)

Prinzip: Der Clumping-Faktor ist auf der Zelloberfläche eines bestimmten Staphylokokkenstammes lokalisiert. Er reagiert mit Fibrinogen, Fibrinmonomeren, löslichen Fibrinmonomerkomplexen und den höhermolekularen, plasminresistenten FSP X und Y.

Zum Test versetzt man 2 geometrische Verdünnungsreihen (Serum mit Zusätzen und Fibrinogen-Standard-Lösung) mit Staphylokokken-Reagenz. Nach 30 Minuten überprüft man beide Verdünnungsreihen auf Agglutination. Das Produkt aus höchster Serumverdünnung und niedrigster Fibrinogenkonzentration, die eine Reaktion zeigen, ergibt die Konzentration der FSP in μg .

Die Methode ist deutlich empfindlicher als die sog. Fibrinpolymerisationszeiten. Selbst FSP-Konzentrationen von $0,5 \mu\text{g/ml}$ lassen sich damit noch nachweisen (Hawiger et al., 27). Nicht erfaßt werden aber die niedermolekularen FSP's D und E. Außerdem ist es denkbar, daß FSP's während des Gerinnungsvorganges in das Gerinnsel eingeschlossen werden. Auch kann das Ergebnis dadurch verfälscht werden, daß Fibrin oder Restfibrinogen bei defekter Gerinnselstruktur ins Serum übertreten (Wenzel et al., 69). Der Staphylokokken-Clumping-Test soll daher möglichst mit anderen Untersuchungen kombiniert werden (z. B. Fibrinpolymerisationszeiten und Fibrinogen-Konz.). Als alleinige Informationsquelle zur Beurteilung des fibrinolytischen Status erscheint er nicht geeignet.

2. Lysezeitbestimmungen

a) Spontanlysetest (Vinazzer, 66)

Prinzip: Man läßt 1 ml Blut ohne Zusätze in einem nicht silikonisierten Glasröhrchen gerinnen. Im Abstand von 30 Min. kontrolliert man die Wiederauflösung bei Inkubation im Wasserbad. Normalerweise tritt innerhalb von 24 Std. keine Lyse auf.

Die Methode gilt als ziemlich unempfindlich (Vinazzer, 66). Ein auffälliges Resultat kommt nur bei beträchtlicher Hyperfibrinolyse vor.

b) Plasma-Lysetest (Markwardt, Hausstein u. Klöcking, 47)

Prinzip: In einem Reagenzröhrchen von 6 - 7 mm Durchmesser werden definierte Mengen von Citratplasma, Trispuffer- u. Streptokinase-Lsg. mit Thrombin-Lösung zur Gerinnung gebracht. Nach Eintritt der Gerinnung platziert man eine Glaskugel von 4 mm Durchmesser auf der Gerinnseloberfläche und mißt die Zeit von der Thrombinzugabe bis zum Durchfallen der Glaskugel auf den Reagenzglasboden. Alle Bestimmungen werden bei 37° C durchgeführt.

Die Methode ist einfach zu handhaben. Wie der Spontanlysetest ist aber auch sie nicht geeignet, die Fibrinolyse isoliert zu beurteilen, da die Zeitdauer bis zur Lyse auch vom jeweiligen fibrinbildenden Potential abhängt. Dieses wird aber nicht getrennt erfaßt. Dieser Einwand gilt auch für die nächsten beiden Verfahren:

c) Euglobulinlyse-Test (Modifikation nach v. Kaulla, 37)

Prinzip: Man verdünnt zellfrei zentrifugiertes Citratplasma mit Aqua bidest. Mit Hilfe von Kohlendioxid bringt man die Lösung auf ein pH von 5,2 - 5,3; dabei werden die sog. Euglobuline ausgefällt, die die meisten Gerinnungs- und Lysefaktoren enthalten. Die Albumine mit den am stärksten wirksamen Antiplasminen bleiben gelöst. Durch erneutes Zentrifugieren isoliert man die Euglobuline im Sediment und verwirft den Überstand mit den Antiplasminen. Man löst das Sediment in gepufferter Kochsalzlösung wieder auf, versetzt die Lösung mit Thrombin und mißt die Zeit vom Gerinnungseintritt bis zur vollständigen Wiederauflösung des Gerinnsels.

Zusätzlich zu dem oben vorgebrachten Einwand ist bei dieser Methode kritisch anzumerken, daß die Ausschaltung der Antiplasmin ein sehr artifizieller Eingriff in das komplexe Fibrinolyse-System ist. Auf die Verhältnisse in vivo läßt sich deshalb nur mit Vorbehalt schließen (Graeff u. Beller, 23).

d) Clot-Lysis-Time (Fearnly, 18)

Prinzip: Man verdünnt Citratplasma soweit, daß die Hemmstoffe der Fibrinolyse kaum noch wirksam sind. Thrombinzusatz löst Gerinnung aus. Durch Verwendung von Phosphatpuffer wird dabei die Gerinnselstruktur so verändert, daß Plasmin leichter angreifen kann. Eine photographische Meßapparatur erlaubt, die Zeit bis zur Gerinnselauflösung automatisch festzuhalten.

Auch mit der Clot-Lysis-Time nach Fearnly läßt sich nicht feststellen, inwieweit das Meßergebnis von einer besonders ausgeprägten oder von einer mangelhaften Fibrinbildung in der Testlösung mitbeeinflusst wird. Durch die starke Verdünnung des Testansatzes schafft man außerdem ein ähnlich künstliches Reaktionsmilieu wie beim Euglobulinlyse-Test. Entsprechend ist die Aussagekraft der Versuchsergebnisse eingeschränkt.

3. Lysebestimmung mit standardisiertem Fibrinsubstrat

a) Fibrinplattenmethode (Astrup und Müllertz, 6)

Prinzip: Die zu testende Lösung (Plasma oder Serum) wird in Einzelportionen auf Rinderfibrin-Platten aufgetropft. Die um diese Testtropfen entstehende aufgehellte Zone (sog. Lysehof) mißt man in zwei senkrecht aufeinander stehenden Durchmessern aus und gewinnt so ein Maß für die fibrinolytische Aktivität.

Es bereitet technisch große Schwierigkeiten, exakt standardisierte Fibrinplatten herzustellen. Die mit dieser Methode gewonnenen Ergebnisse sind deshalb nur halb-quantitativ.

Durch Erhitzen der Fibrinplatten läßt sich Plasminogen inaktivieren, das an den Fibrinplatten adsorbiert ist. Derart behandelte Platten messen die reine Plasminwirkung der Testflüssigkeit (Lassen, 42). Die Erhitzung der Platten denaturiert aber auch z. T. Fibrin, so daß sich die Lysehöfe nicht mehr scharf abgrenzen lassen. Die Methode wird damit weniger empfindlich (Stamm, 64).

b) Fibrinolysemessung in Glasröhrchen auf der Grundlage eindimensionaler Diffusion (Yasukouchi u. Watanabe, 74)

Prinzip: Glasröhrchen von 75 mm Länge und 3,5 mm Innendurchmesser werden bis zu einer vorgegebenen Markierung mit einer definierten Menge von Fibrinogen (plasminreich oder plasminfrei) in Phosphatpuffer aufgefüllt. Unmittelbar vor dem Einpipettieren wurde der Fibrinogen-Puffer-Lösung Thrombin beigemischt.

Während der folgenden einstündigen Lagerung bei Raumtemperatur gerinnt die Lösung in den Glasröhrchen. Danach überschichtet man die Fibrinsäulen mit der zu testenden Lösung. Vorgeschlagen werden dazu:

1. reine Plasminlösung
2. Euglobulin + Streptokinase- bzw. Urokinase-Lösung,
3. mit Euglobulin verdünntes Plasma (Yasukouchi u. Watanabe, 74, Yasukouchi et al., 75).

Anschließend inkubiert man die Röhrchen (mit Paraffin abgedeckt) bei 37° C zwischen 12 und 18 Std. (je nach Testflüssigkeit). Nach der Inkubation ist von der ursprünglichen Fibrinsäule ein bestimmter Anteil abgedaut. Diese sog. Lysehöhe (in mm) erfaßt die Fibrinolyse quantitativ.

Dieser Test, der von einem japanischen Arbeitsteam vorgeschlagen wurde, gilt als präzise und reproduzierbar bei relativ geringem methodischem Aufwand. Sein gewichtiger Nachteil liegt darin, daß offenbar unverdünntes oder auch aktiviertes Plasma (nicht Euglobuline) keine ausreichende Lysemessung erlauben. Solange Euglobuline oder noch artifiziiellere Lösungen notwendig sind, gilt der entsprechende Einwand wie bei der Euglobulinlyse-Zeitmessung.

4. Thrombelastographie nach Hartert (26)

Prinzip: Mit dem Thrombelastographen läßt sich der Gerinnungsablauf einschließlich der Fibrinolyse photokymographisch erfassen. Gemessen wird sowohl die Gerinnungsgeschwindigkeit als auch laufend die Scherelastizität des Fibringerinnsels bzw. des sich wiederauflösenden Fibrins. Folgende technische Einrichtung macht dies möglich: Eine mit Blut gefüllte Stahlküvette pendelt (von einem Synchronmotor angetrieben) um ihre Hochachse. Von oben ragt ein torsionselastisch aufgehängter zylindrischer Stift in die Küvette. Unter Fibrinbildung wird die Zähigkeit der Blutmasse so groß, daß der

Torsionswiderstand der Zylinderaufhängung schließlich überwunden wird und der eingetauchte Stift bei jeder Umdrehung mitgezogen wird. Die Zylinderbewegungen werden dabei mittels Lichtquelle und Spiegel auf Photopapier registriert.

Der Nachteil der Methode liegt in der sehr kostspieligen und anfälligen Apparatur. Außerdem kommt es oft vor, daß das Gerinnsel im Apparat künstlich verändert wird. Sehr häufig ist z. B. ein sog. Abrißphänomen zu beobachten, so daß die Fibrinolyse nicht mehr weiter verfolgt werden kann (Schorer, 62).

Die Vielzahl und Vielfalt der hier vorgestellten Methoden läßt erkennen, wie schwierig es ist, Fibrinolyse nach den Erfordernissen der Klinik zu messen.

Jede der unter 1. bis 4. aufgelisteten Methoden hat in mindestens einer Hinsicht Vorteile aufzuweisen. Immer wird dies jedoch durch teilweise gravierende Nachteile in den übrigen Bereichen erkaufte.

Im Vergleich dazu hat die SFPL unserer Meinung nach den Vorteil, daß sie gleichzeitig exakt und reproduzierbar mißt, die einzelnen Fibrinolysekomponenten größtenteils erfaßt und die Verhältnisse in vivo weitgehend widerspiegelt.

Wie auf Seite 2 bereits erläutert, liegt ihr Nachteil in der relativ aufwendigen Methodik. Ob diese sich vereinfachen läßt, untersuchen wir mit den folgenden Experimenten.

EXPERIMENTELLER TEIL

I. VERWENDETE MATERIALIEN UND GERÄTE

- (1) Standard-Fibrinpapier MN 260 N, Charge 98 (Machery-Nagel & Co., Düren)
- (2) Chromatographiepapier MN 260 N, Charge 98 (Machery-Nagel & Co., Düren) zur Leerwertbestimmung
- (3) Einmalspritzen (Braun): 5, 10 und 20 ml und Einmalkanülen Sterikan^R L 1 L
- (4) Natriumcitrat 3,8 %ig, neutral
- (5) Citratblut 1 : 5 bzw. 1 : 10
- (6) p-(aminomethyl)-benzoesäure = PAMBA als Gumbix^R-Amp. (50 mg/Amp.)
- (7) Veronal-Na-HCl-Puffer (0,05 M, pH 7,3)
- (8) Aqua bidest.
- (9) Test-Streptokinase (Behring), 5000 U/Amp.
- (10) Amidoschwarzlösung 10 B (Merck)
- (11) Elphorentfärber (900 ml Methanol, 100 ml Eisessig)
- (12) 0.1n NaOH
- (13) Vorratsbehälter für Aqua bidest., Amidoschwarz und Elphorentfärber mit Ableitungs-Schlauchsystem aus Kunststoff
- (14) "Automatikbox" mit säurefesten Magnetventilen
- (15) Zeitschaltwerk
- (16) Elektromotor mit vorgeschaltetem Exzenter (60 rpm, 1,5 cm Hub)
- (17) Inkubationsboxen und Eluationsboxen aus Kunststoff mit je 11 vertikalen Untersuchungskammern
- (18) Papierhalter für vertikale Aufhängung von 11 Standard-Fibrinpapieren
- (19) Brutschrank (37° C) und Brutschrank (30° C)
- (20) Minimum-Maximum-Thermometer
- (21) Photometer "Eppendorf" mit Monochromatfilter (Hg 546 nm)

- (22) Makro Küvetten (Nr. 1101 ratiolab^R)
- (23) Plastikröhrchen (10 ml), sterilisiert und Glaskölbchen (25 und 50 ml), sterilisiert
- (24) Zentrifuge AHT, Type 5000
- (25) Glaspipetten (1, 2, 5, 10 und 25 ml)
- (26) Objektträgerpinzetten, Parafilm^R-Folie

Abb. 4 veranschaulicht den funktionellen Zusammenhang der Geräte (13) bis (16).

II. VERSUCHSPROGRAMM

Die Problemstellung dieser Arbeit wurde im theoretischen Teil eingangs erläutert. Daraus ergab sich folgendes Versuchsprogramm:

- 1.) Verkürzung der Inkubationszeit von 20 Std. bis auf 8 Std. in 2-stündigen Intervallen = Zeittestung.
- 2.) Senkung der Inkubationstemperatur von 37° C auf 30° C und auf Raumtemperatur = Temperaturtestung.
- 3.) Änderung der Citratblutverdünnung von 1 : 5 auf 1 : 10 = Verdünnungstestung.

Die Versuchsbedingungen sind dabei so einzurichten, daß sich immer nur ein Parameter gegenüber der Originalmethode der SFPL ändert. In getrennten Ansätzen erfolgt also:

die Zeittestung bei 37° C mit der Verdünnung 1 : 5,

die Temperaturtestung mit der Verdünnung 1 : 5 bei 20 Std. Inkubationszeit und

die Verdünnungstestung bei 20 Std. Inkubationszeit und 37° C Inkubationstemperatur.

Der Bezugswert für diese Modifikationen liegt in der 20-Std.-Messung der Zeittestung. Hier sind alle Bedingungen der SFPL-Originalmethode erfüllt.

Für die zusätzlichen Fragestellungen ist ein weiterer Ansatz notwendig:

- 4.) Aktivierung des Testplasmas mit 10, 50 und 100 IE Streptokinase/ml = Aktivierungstestung.

Die Aktivierungstestung folgt mit 20 Std. Inkubationszeit, 37° C Inkubationstemperatur und der Verdünnung 1 : 5 den Vorschriften der Originalmethode.

Anmerkung zum Versuchsprogramm:

Bisher liegen noch keine systematischen Untersuchungen mit Inkubationszeitverkürzungen vor. Theoretisch ist es daher denkbar, daß wichtige Veränderungen in einem größeren Zeitroster (z. B. 4 bis 5 Std.-Intervalle) nicht mehr zu erkennen sind.

Wir untersuchen deshalb den Bereich zwischen 20 Stunden und 8 Stunden Inkubationszeit in nur zweistündigen Intervallen.

Aus entsprechenden Gründen enthält die Temperaturtestung zwischen den beiden Bereichen 37°C und Raumtemperatur bei 30°C noch eine Zwischenstufe.

III. VERSUCHSDURCHFÜHRUNG

Zur Untersuchung benutzten wir Nüchternblut, das 11 gesunden männlichen Probanden (23 bis 33 Jahre) an jeweils einem Untersuchungstag zwischen 8.¹⁵ und 9.³⁰ Uhr abgenommen wurde. Bis zum Inkubationsbeginn bzw. der Kühlstellung des Plasmas vergingen maximal 75 Minuten.

Um den detaillierten Einblick in den Versuchsablauf zu erleichtern, geben wir nun eine Arbeitsanleitung für die einzelnen Versuchsschnitte wieder, die wir bei allen Versuchen genau befolgt haben. So läßt sich auch zeigen, wie weit wir den Versuchsablauf standardisiert haben.

1. a) Vorbereitung

Es empfiehlt sich, vor der Blutentnahme die benötigten Reaktionslösungen bereitzustellen, damit das Blut unverzüglich weiterverarbeitet werden kann. Dazu mischt man für die

a) Fibrinolysehemmer-Lösung:

1 Amp. Gumbix^R (50 mg PAMBA in 5 ml) mit 15 ml Aqua bidest. (Ampuwa^R). Somit enthält 1 ml dieser "Stopplösung" 2,5 mg PAMBA.

b) Streptokinase-Lösungen:

Eine Verdünnungsreihe mit Lösungen von 10, 50 und 100 U Streptokinase/ml in Aqua bidest. (Ampuwa^R).

Die Fibrinolysehemmer-Lösung wird für jeden Versuch neu hergestellt. Die Streptokinase-Lösungen werden für max. zwei Versuche verwendet, wenn diese innerhalb von 7 Tagen stattfinden. In der Zwischenzeit sind die Streptokinase-Lösungen im Kühlschrank bei 4° C zu lagern.

Unmittelbar vor der Blutentnahme wird der Papierhalter für die Inkubationsbox I mit 10 Standard-Fibrinpapieren und 1 Chromatographiepapier beschickt. Dazu muß unbedingt eine Pinzette benutzt werden, da die Standard-Fibrinpapiere nicht mit den Fingern berührt werden dürfen.

Der aufgefüllte Papierhalter wird von oben in die Inkubationsbox I eingebracht. In jede ihrer 11 vertikalen Kammern ragt nun jeweils 1 Papier (Kammer 1 - 10: SFP; Kammer 11: Chromatographiepapier).

b) Blutentnahme

Die Venenpunktion erfolgt mit einer 1er Kanüle. 60 ml werden als Citratblut in 3 Portionen à 20 ml in der Verdünnung 1 : 5 gewonnen (1 Teil 3,8 %ige Natriumcitrat-Lösung und 4 Teile Blut). Außerdem 5 ml Citratblut in der Verdünnung 1 : 10 (1 Teil 3,8 %ige Natriumcitrat-Lösung und 9 Teile Blut).

Zusätzlich werden 10 ml Nativblut gesammelt und zur Bestimmung der Serumspiegel von Cholesterin und Triglyceriden in das Hauptlabor weitergeleitet.

Die beiden Citratblutproben (Verdünnung 1 : 5 und 1 : 10) zentrifugiert man nun gleichzeitig 5 Min. bei 3000 rpm. Danach Abheberung der Plasmaproben, wobei die Grenzschicht zu den Formelementen verworfen werden soll.

c) Herstellung der Plasma-Pools

Man sammelt das 1 : 5 verdünnte Citratplasma in einem sterilisierten Glaskölbchen und mischt durch vorsichtiges Schwenken. (Nicht schütteln!) Von diesem homogenen Plasmapool pipettiert man etwa die Hälfte in ein weiteres sterilisiertes Glaskölbchen, wobei man aber die effektiv pipettierte Plasmamenge genau erfassen muß, da nun die identische Menge Fibrinolysehemmer-Lösung dazu gegeben werden soll. Man schwenkt dieses zweite Poolgefäß ebenfalls vorsichtig zur Durchmischung. Damit stehen von dem 1 : 5 verdünnten Citratplasma bereit:

Ein Citratplasmapool ohne Zusätze = Testplasma a

Ein Citratplasmapool, in dem die
fibrinolytische Aktivität durch
PAMBA gestoppt wurde = Normplasma a

Die im Verhältnis 1 : 10 verdünnte, nur 5 ml umfassende Plasmaportion wird vollkommen analog verarbeitet. Man erhält so Testplasma b und Normplasma b.

Das Normplasma a in Kammer 2 wird sowohl für die 20-Std.-Messung der Zeittestung als auch für die Aktivierungstestung gewertet.

Die Schematisierung der Abb. 2, 3 u. 6 kann den Eindruck erwecken, als seien die Flüssigkeiten innerhalb der Untersuchungskammern streng geschichtet. Dies ist in Wirklichkeit nicht der Fall. Da zuletzt die weitaus größte Teilmenge (Puffer) einpipettiert wird, ist die gewünschte homogene Durchmischung garantiert. Dabei ist die Gesamtmenge der Flüssigkeiten in den einzelnen Untersuchungskammern so groß, daß jedes SFP in seiner Kammer vollständig in der Flüssigkeit untergetaucht ist.

Nun wird Box I mit einem gut dichtenden Deckel verschlossen und in den bei 37^o C justierten Brutschrank gestellt. Damit hat die Inkubation begonnen.

Die beiden verbliebenen Plasma-Poolgefäße (Testplasma a und Normplasma a) verschließt man luftdicht mit Parafilm^R-Folie und lagert sie bei 4^o C im Kühlschrank. Sie werden von jetzt an nur kurzfristig für die späteren Versuchsabschnitte aus dem Kühlschrank entnommen.

Zwei Stunden nach dem Inkubationsbeginn von Box I nimmt man die Box wieder aus dem Brutschrank und pipettiert wie oben angegeben die Reagenzien für die 18-Std.-Messung der Zeittestung in Kammer 8 und 9. Danach wird Box I abgedeckt in den Brutschrank zurückgestellt. Diese Prozedur soll maximal 2 Minuten dauern.

e) Ansatz der Temperaturtestung

Mit einer Verzögerung von 3 Stunden gegenüber dem Inkubationsbeginn von Box I (Erklärung hierfür s. S. 27) wird die Temperaturtestung in Box II und Box III gestartet. Vor dem Einpipettieren müssen auch hier die beladenen Papierhalter in die Boxen eingesenkt sein. Für die Norm- und Testlösungen der Temperaturtestung benötigt man jedoch nur 2 SFP's pro Box. Daneben werden jeweils 2 Chromatographiepapiere mituntersucht.

In die Untersuchungskammern Nr. 1 beider Boxen pipettiert man je 1 ml Testplasma a und in die Untersuchungskammern Nr. 2 je 1 ml Normplasma a. Analog zu Box I werden die Test- und Normplasmen mit Puffer auf 8 ml Gesamtflüssigkeit verdünnt.

Box II inkubiert man nun in einem zweiten Brutschrank bei konstant 30° C.

Box III wird bei Raumtemperatur inkubiert. Der Standplatz der Box darf dabei nicht im Bereich direkter Sonneneinstrahlung liegen.

Neben der Box platziert man zur Kontrolle von Raumtemperaturschwankungen ein Minimum-Maximum-Thermometer. Wie schon Box I müssen auch die anderen Boxen zur Inkubation alle mit einem dicht abschließenden Deckel versehen sein.

f) Restansatz der Zeittestung

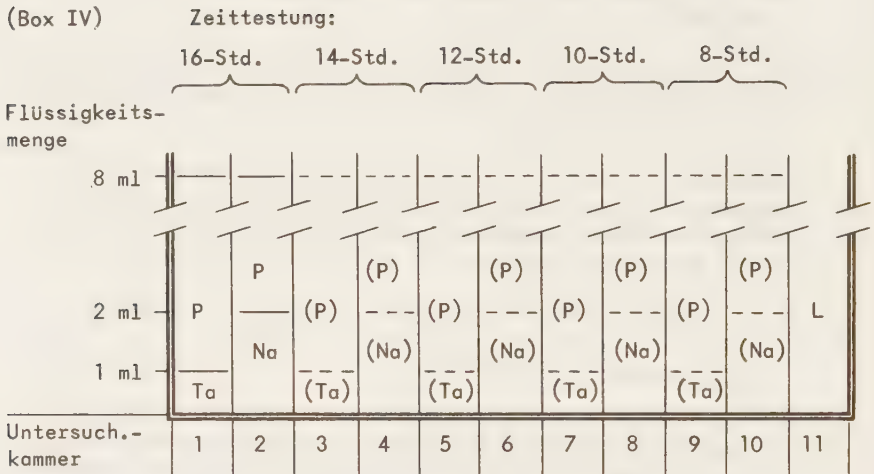
Etwa eine Dreiviertelstunde nach dem Ansatz der Temperaturtestung belädt man den Papierhalter für Box IV. Dieser wird komplett (mit 10 SFP's und 1 Chromatographiepapier) gefüllt und in die Box eingebracht.

Genau 4 Stunden nach Inkubationsbeginn von Box I startet man die Inkubation von Box IV im 37° C-Brutschrank.

Zunächst sind nur die ersten beiden Untersuchungskammern für die 16-Stunden Messung aufgefüllt.

Abb. 3 zeigt dies:

Abb. 3:



Legende: P = Puffer (Veronal -HCl-Puffer, 0.05 M, pH 7,3)

Ta = Testplasma a

Na = Normplasma a

(Ta) bzw. (Na) bzw. (P) = Reagenzien, die im Rahmen der Zeittestung erst nach bereits begonnener Inkubation zugegeben werden

L = Chromatographiepapier (Leerwert): keine Reagenzien in der Untersuchungskammer

Im Abstand von 2 Std. pipettiert man dann die Flüssigkeiten in die jeweils nächsten beiden Untersuchungskammern ein.

Auf diese Weise werden die Kammern 9 und 10 als letzte für die 8-Stunden-Messung aufgefüllt.

Box IV soll sich dabei (ebenso wie Box I) zum nachträglichen Einpipettieren nicht länger als 2 Minuten außerhalb des Brutschrankes befinden.

g) Beendigung der Inkubation

Die Inkubationszeiten von Box I und Box IV enden gleichzeitig. Box I war somit 20 Std. und Box IV 16 Std. inkubiert. Die tatsächliche Inkubationszeit für die einzelnen Untersuchungskammern innerhalb der Boxen ist jedoch durch nachträgliches Einpipettieren der Flüssigkeiten abgestuft wie in den Abb. 2 und 3 gezeigt.

Der nun folgende Arbeitsgang soll sich nahtlos an die Inkubation anschließen. Dies ist wichtig, da der fibrinolytische Prozeß an den SFP's auch dann weiter abläuft, wenn diese (aus der Inkubationsbox herausgezogen) im Papierhalter bei Raumtemperatur abgestellt sind.

Damit ist auch erklärt, weshalb die Temperaturtestung mit 3 Std. Verzögerung angesetzt wurde: der nächste Versuchsabschnitt ("Automatik"-Arbeitsgang) dauert 2 3/4 Std. Für die Durchführung des Experiments stehen 2 baugleiche Automatik-Systeme zur Verfügung. Es können deshalb nur die Papiere aus 2 Boxen gleichzeitig im "Automatik"-Arbeitsgang "gefahren" werden.

Die Inkubationszeit von Box II und Box III (Temperaturtestung) endet deshalb erst, nachdem die Papiere aus Box I und Box IV das Automatik-System wieder verlassen haben.

h) "Automatik"-Arbeitsgang

Dieser Versuchsteil umfaßt Wässerung, Anfärbung und teilweise Wiederentfärbung der inkubierten SFP's und Chromatographiepapiere.

Mit Hilfe eines von Rath (56) konzipierten und gebauten Automaten laufen die Arbeitsschritte vollautomatisch ab. Dieses Lysegerät 78 steuert über ein Zeitschaltwerk den Zu- und Abfluß genau definierter Mengen von Aqua bidest. (Wässern), Amidoschwarz (Anfärbung) und Elphorentfärber (teilweise Wiederentfärbung) durch säurefeste Magnetventile in zwei offene, parallel geschaltete "Automatikboxen".

Die Chemikalien werden dazu über ein Plastikschauchsystem aus 50 cm höher gelagerten Vorratsbehältern zu diesen Ventilen geführt. Nach dem Gebrauch fließen sie in einen gemeinsamen Sammelkanister ab.

Zum Beladen der Automatikboxen zieht man die Papierhalter mit allen Papieren aus den Inkubationsboxen - die Reagenzien in den Untersuchungskammern werden verworfen - und senkt sie von oben her in die Automatikboxen ein. Zwischen diesen befindet sich ein Stativ, das 2 Elektromotoren mit vorgeschalteten Exzentern trägt. Die Motoren sind vertikal verschiebbar und horizontal frei drehbar montiert.

Man schwenkt jetzt über jede Automatikbox einen Motor und befestigt den Faden des Papierhalters am Exzenter.

Bei eingeschaltetem Elektromotor bewirkt die Exzenterumdrehung eine Hub- und Senkbewegung des Papierhalters von 1,5 cm/sec.

Beide E-Motoren verschiebt man vertikal so weit, bis die daran hängenden Papierhalter den Boden ihrer Automatikbox gerade leicht berühren. Wenn man die Motoren in dieser Stellung fixiert, bleiben die Papiere (wie beabsichtigt) auch im oberen Umkehrpunkt der Hub- und Senkbewegung bei gefüllter Box in der Flüssigkeit.

Das Lysegerät wird nun eingeschaltet. Damit läuft dieser Arbeitsgang in 2 3/4 Stunden vollautomatisch ab. Abb. 4 gibt einen Überblick über das oben beschriebene System (modifiziert nach Buchheim, 12):

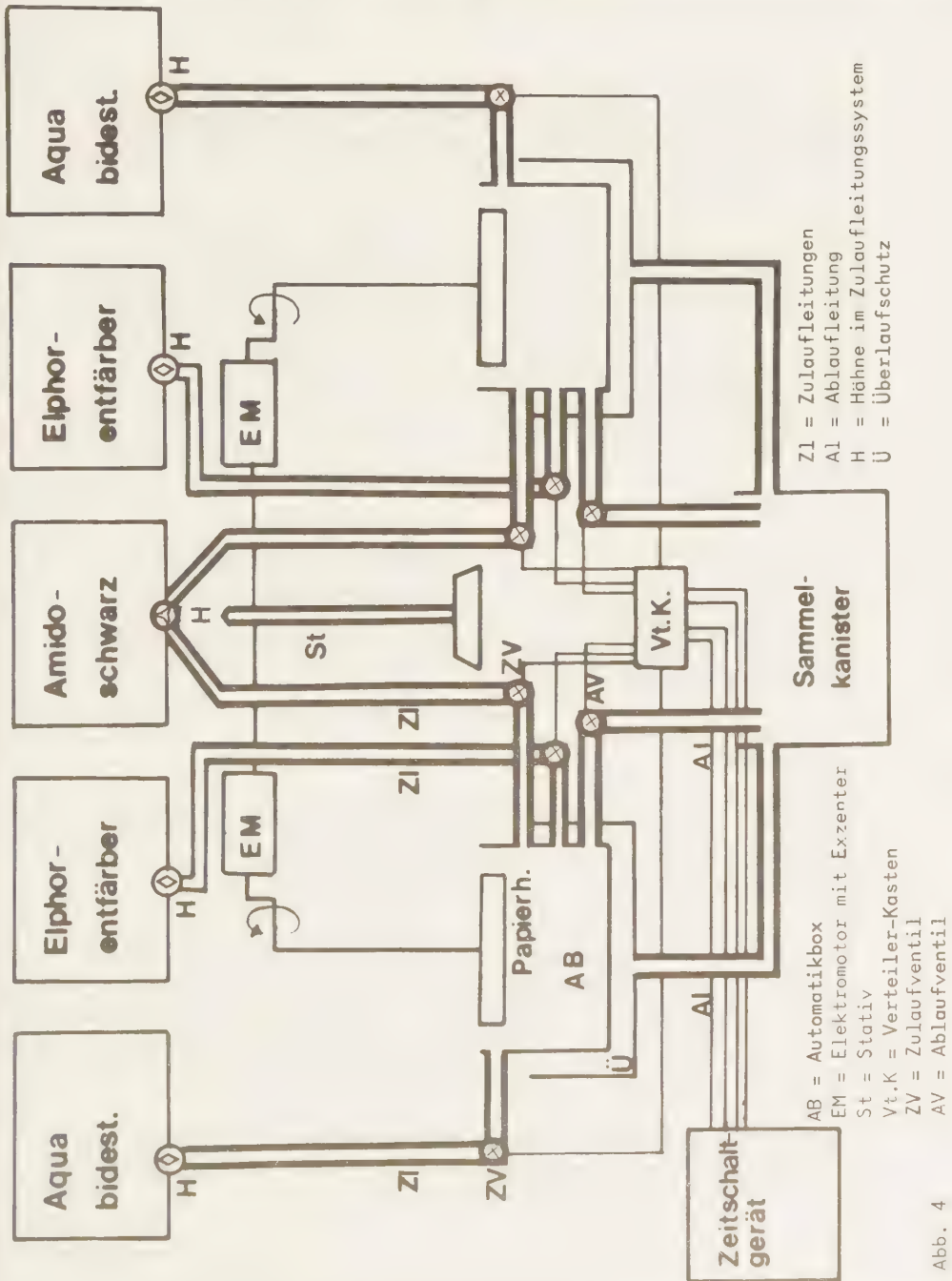


Abb. 4

Bei unserem Versuchsablauf bringen wir zunächst die Inkubationsboxen I und IV in den Automatik-Arbeitsgang ein. Danach werden sie weiterbehandelt wie unter i) und k) beschrieben.

Aus Inkubationsbox II und III fallen jeweils nur 4 Papiere an. Da für ihre Bearbeitung nur eine Automatikbox notwendig ist, sperrt man die Abflußhähne der Chemikaliientanks für die andere Automatikbox. Der Arbeitsgang innerhalb der einzeln betriebenen Automatikbox ändert sich dadurch weder quantitativ noch qualitativ.

Auch bei der anschließenden Trocknung und Eluation gilt für die Einzelbestimmung, was im folgenden für den Doppelbetrieb beschrieben ist:

i) Trocknung

Nach dem Automatik-Arbeitsgang trocknet man die Papiere in den Papierhaltern 10 Minuten lang bei 37°C im Brutschrank. Danach prüft man, ob einzelne Papiere fleckig angefärbt sind. In diesem Fall werden die Nummern dieser Papiere notiert, da ihre Ergebnisse nur mit Vorbehalt zu akzeptieren sind. So können irreguläre Abweichungen erfaßt werden.

k) Eluation

Während der Trocknungszeit werden 2 Eluationsboxen vorbereitet. Diese Boxen entsprechen den Inkubationsboxen, die einzelnen Untersuchungskammern sind jedoch größer dimensioniert. Jede dieser Kammern wird mit 25 ml 0.1 n NaOH aufgefüllt.

Man schwenkt jetzt beide Elektromotoren am Stativ über die Eluationsboxen. Die Papierhalter sind wieder an den Exzentern aufgehängt. Bei diesem Arbeitsschritt ragen die darin vertikal gehaltenen einzelnen Papiere aber nicht in einen gemeinsamen Flüssigkeitsraum (wie in den Automatikboxen), sondern jedes Papier hat sein eigenes Kompartiment: die Untersuchungskammer mit derselben laufenden Nummer wie in der Inkubationsbox.

Die eingeschalteten E-Motoren werden wieder soweit abgesenkt, daß die Papiere auch hier im oberen Umkehrpunkt der Hub-Senk-Bewegung nicht aus der Flüssigkeit auftauchen.

Beide E-Motoren laufen in dieser Position genau 30 Minuten. Die Eluation wird beendet, indem man die Papierhalter mit den Papieren aus den Eluationsboxen herauszieht. Es folgt der letzte Versuchsabschnitt:

e) Photometrische Auswertung

Gemessen wird die Extinktion (E) der Eluationsflüssigkeiten aus den einzelnen Kammern der Eluationsboxen. Dies geschieht mit dem "Eppendorf"-Photometer (mit Monochromatfilter 546 nm).

Für die Flüssigkeitsportionen einer Eluationsbox verwendet man eine Makro-(Einmal)Küvette. Vor der Messung ist die Küvette mit der jeweils nächsten Flüssigkeitsprobe gründlich vorzuspülen.

2. Synopse des Versuchsablaufes

Abb. 5 zeigt zusammenfassend den Versuchsablauf von der Inkubation der Boxen I - IV bis zur photometrischen Auswertung. Die Aufteilung und Reihenfolge der Ansätze für die Zeit-, Temperatur-, Verdünnungs- und Aktivierungstestung läßt sich daraus nochmals ersehen:

Abb. 5:

Inkub.Beginn Box I: bei 37°C
Verdünnungs-u.Aktiv.-Testung
Zeittest.: 20-Std.

nachträgl. Einpipettierung
für Zeittestung: 18-Std.

Inkub.Beginn Box II u. III
Temperaturtest.: II bei 30°C
Box III: Raumtemperatur

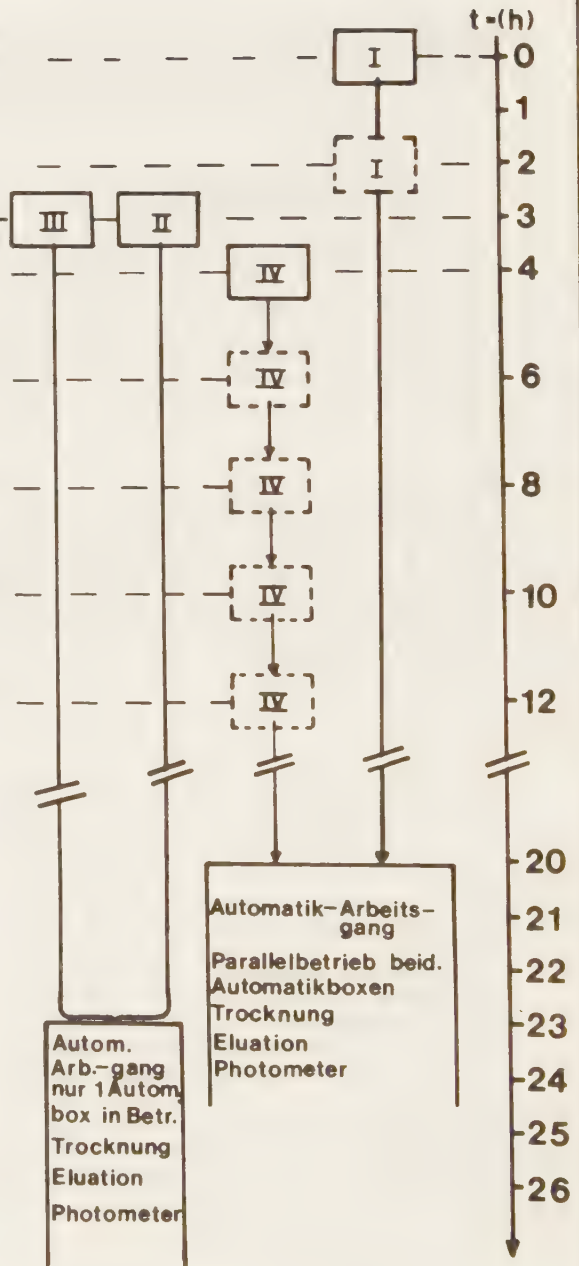
Inkub.Beginn Box IV: bei 37°C
Zeittestung: 16-Std.

nachträgliche Einpipettierung
für Zeittestung: 14-Std.

nachträgliche Einpipettierung
für Zeittestung: 12-Std.

nachträgliche Einpipettierung
für Zeittestung: 10-Std.

nachträgliche Einpipettierung
für Zeittestung: 8-Std.



3. Errechnung der Lysequoten

Bei der SFPL errechnet sich die Lysequote L nach folgender Formel:

$$L (\%) = 100 - \frac{(E)\text{Eigenlysewert} - (E)\text{Leerwert}}{(E)\text{Normwert} - (E)\text{Leerwert}} \times 100$$

Die Eigenlysewerte beziehen wir aus den Eluationsproben der SFP's, die zuvor in Testplasma inkubiert waren. Entsprechend erhalten wir die Normwerte aus der Eluationsflüssigkeit von Normplasma-SFP's.

Ein Leerwert ist in jeder Box mitbestimmt. Aus der Temperaturtestung fallen je 2 Leerwerte an; hier wird gemittelt. Bei der Aktivierungstestung setzt man anstelle der Eigenlysewerte die sog. aktivierten Lysewerte in die Formel ein. Sie ergeben sich aus den Eluationsproben der SFP's, die in aktiviertem Testplasma inkubiert waren.

4. Fehlerquellen

a) Bekannte Fehlerquellen

α) Blutentnahme:

Die Vene muß sofort richtig punktiert werden. Ein "Herumstochern" mit mehrmaligen Aspirationsversuchen provoziert mit Sicherheit zu hohe Lysequoten (Aktivierung von Plasmin durch Gewebeaktivator; außerdem verständliche adrenerge Reaktion des Probanden).

Auch eine zu forsche Aspiration nach sauberer Venenpunktion kann durch Hämolyse abnorm hohe Werte ergeben (besonders bei zu dünnen Kanülen).

β) Inkubationsvorbereitung:

Nur oberflächlich gereinigte Papierhalter und Inkubationsboxen, zu alter Veronal-Puffer (flockige Trübung), verfallene Streptokinäselösungen, falsch gelagerte SFP's (diese müssen trocken und luftdicht verpackt bei 4° C abgelegt sein) oder kontaminierte SFP's (Fingerabdrücke!) verfälschen allesamt die Ergebnisse. Auch Pipettierfehler beim Auffüllen der Inkubationsboxen gehören hierher.

Weitere Störfaktoren sind:

7) bei der Inkubation:

Temperaturschwankungen durch häufiges Öffnen des (evtl. einzigen) Brutschrankes im Rahmen anderer Laborbestimmungen.

Über- oder Unterschreiten der festgelegten Inkubationszeit um mehr als 15 Minuten.

8) beim Automatik-Arbeitsgang:

Wechselnde Flüssigkeitsmengen in den Automatikboxen durch Ventilstörungen. Sie lassen sich summarisch erkennen, wenn man nach dem Automatik-Arbeitsgang den jeweiligen "Ist-Flüssigkeitsspiegel" in den Chemikaliientanks mit dem entsprechenden "Soll-Flüssigkeitsspiegel" vergleicht. Dieser ist auf den Tanks markiert.

Überwärmung des Elphorentfärbers ergibt zu niedrige Extinktionswerte (8). Die Tanks dürfen deshalb nicht im direkten Sonnenlicht stehen. Außerdem muß bei Messungen im Hochsommer die Raumtemperatur mit einem Minimum-Maximum-Thermometer kontrolliert werden.

9) bei der Eluation:

Wenn man beim Eluationsende den Papierhalter in einem Zug entfernt, tropft sehr leicht Eluationsflüssigkeit von den Papieren in benachbarte Kammern. Es ist deshalb ratsam, den Papierhalter zuerst genau vertikal anzuheben, bis die Papiere aufgetaucht sind und in die eigene Kammer abtropfen können. Außerdem soll die Eluationsbox vor der photometrischen Auswertung nicht zu lange offen stehen bleiben. Die Verdunstung von Eluationsflüssigkeit kann das Ergebnis verfälschen.

3) Photometrische Auswertung:

Fehler können sich ergeben, wenn die Photometervorwärmung von 30 Minuten nicht eingehalten wird. Die Verwendung von zerkratzten oder nicht vorgespülten Küvetten kann weitere Falschmessungen verursachen.

b) Mögliche zusätzliche Fehlerquelle

Die besonderen Versuchsbedingungen bei dieser Arbeit lassen an eine weitere Fehlerquelle denken:

Es liegen nämlich bisher keine Untersuchungen darüber vor, ob und wie fibrinolytische Prozesse durch Plasmlagerung bei 4° C beeinflußt werden.

Beitinger (8) wies zwar nach, daß ein signifikanter Abfall der Lysequote selbst nach 5 Monaten noch nicht nachzuweisen ist, wenn mit Streptokinase aktiviertes Citratplasma bei -30°C aufbewahrt wird. Hieraus zu schließen, die nicht einmal 24 Stunden dauernde, gefrierpunktsnahe Lagerung dürfte dann die Lysequote ebenfalls nicht verändern, ist zwar naheliegend, aber nicht unbedingt richtig.

Das Problem betrifft vor allem die Zeittestung. Bis zum nachträglichen Einpipettieren für die 8-Stunden-Messung lagern Test- und Normplasma a als letzte Portionen 12 Stunden im Kühlschrank bei 4°C . Wenn dies die Lysequote beeinflusst, ist die eingangs für den gesamten Versuchsablauf gestellte Bedingung nicht mehr erfüllt, wonach immer nur ein Parameter gegenüber der bisherigen Originalmethode modifiziert sein soll.

5. Nachversuch

Um dieser Frage weiter auf den Grund zu gehen, schlossen wir in einem Nachversuch eine Zeittestung an, bei der dieser fragliche Systemfehler ausgeschaltet war.

Wir bestimmten gleichzeitig im Citratblut 1 : 5 von 3 gesunden männlichen Probanden die Lysequoten nach 8, 11, 14, 17 und 20 Stunden Inkubationszeit bei 37°C .

Im Gegensatz zu den Meßschritten der Zeittestung im Hauptversuch sind die Zeitintervalle im Nachversuch länger, als der Automatik-Arbeitsgang dauert. Wir konnten daher die Inkubationszeit aller Plasmaportionen gleichzeitig, ohne Zwischenlagerung bei 4°C in 5 Boxen beginnen.

Die Aufbereitung der Test- und Normplasmen erfolgte nach demselben Modus wie für Test- und Normplasma a auf S. 22 beschrieben. Zusätzlich stellten wir von jedem Probanden ein 2. Normplasma her, das die doppelte Konzentration an Fibrinolysehemmer-Lösung enthielt: 5 mg Gumbix^R pro ml Stopplösung.

Bei den obengenannten Meßzeitpunkten nahmen wir jeweils eine der fünf gleichen Inkubationsboxen aus dem Brutschrank und verarbeiteten die darin inkubierten Papiere ohne Verzögerung (über Automatik-Arbeitsgang, Trocknung und Eluation) bis zur photometrischen Auswertung.

Abb. 6 zeigt das Verteilungsmuster der Reagenzien in den fünf Inkubationsboxen des Nachversuches:

Abb. 6:

Flüssigkeits- menge	Proband 1			Proband 2			Proband 3				
8 ml											
2 ml	P	P	P	P	P	P	P	P	SFP ₁	L	
1 ml	T	N	N ²	T	N	N ²	T	N	N ²		
Untersuchungs- kammer	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11

Legende: P = Puffer (Veronal-HCl-Puffer, 0.05 M, pH 7,3)

T = Testplasma N = Normplasma (2,5 mg Gumbix/ml)

N² = Normplasma (5,0 mg Gumbix/ml)

SFP₁ = Standard-Fibrinpapier leer: (keine Reagenzien)

L = Chromatographiepapier (Leerwert): (keine Reagenzien)

6. Statistische Auswertung

Wir tabellierten die Extinktionsmessungen (E) aus allen Versuchen und werteten sie statistisch aus:

Die Lysequotenergebnisse aus den verschiedenen Versuchsansätzen überprüften wir mit Hilfe einer Rangvarianzanalyse (Friedman-Test, 57) auf statistische Signifikanz.

Dieser Test bietet sich an, da mit der Prozentualisierung der Ergebnisse sicher keine Normalverteilung mehr vorliegt. Der Test eignet sich außerdem für zweiseitige Fragestellungen (vergrößern oder vermindern die Modifikationen der Originalmethode die Ergebnisse?) und für kleinere Stichproben.

Die Versuchsdaten prüft man mit dem Friedman-Test folgendermaßen: Man stellt die Lysequoten aus den verschiedenen Testansätzen pro Versuchsperson blockweise zusammen.

Innerhalb dieser Blöcke werden die Lysequoten ihrer Größe nach geordnet und erhalten Rangplätze. Daraufhin addiert man die Rangplätze einander entsprechender Stichproben zur Rangsumme (z. B. die Rangplätze der Lysequoten aus der Temperaturtestung 30°C von allen Versuchspersonen zur Rangsumme $R_{30^{\circ}\text{C}}$).

Die so ermittelten Rangsummen können jetzt nach Wilcoxon und Wilcoxon multipel miteinander verglichen werden. Man bildet dazu die Differenz aus denjenigen Rangsummen, die man miteinander in Beziehung setzen möchte.

Aus einschlägigen Tabellen (57) lassen sich jetzt für die gewählten Irrtumswahrscheinlichkeiten die sog. kritischen Rangdifferenzen ablesen, von denen an ein signifikanter Unterschied der Ergebnisse besteht.

Die Frage, ob die Ergebnisse der Zeittestung in den Hauptversuchen von denjenigen des Nachversuchs signifikant abweichen, untersuchten wir mit dem sog. K-Sample-Friedman-Test.

Da bei den Zeittestungen der beiden "Samples": Hauptversuche/Nachversuch drei identische Meßschritte vorliegen (8-Std., 14-Std.- und 20-Std.-Messung), konnten wir diese drei Werte aus beiden Versuchsgruppen miteinander vergleichen.

Es werden hierzu für jeden der drei Meßschritte innerhalb der Samples sog. normierte Rangsummen gebildet. (Mit der Normierung wird die unterschiedliche Fallzahl beider Samples berücksichtigt.)

Man erhält also pro Sample und Meßschritt eine normierte Rangsumme. Für jeden der drei Meßschritte rechnet man nun die normierten Rangsummen beider Samples gegeneinander zu einem χ^2 -Wert auf.

Auf Seite 52 prüfen wir, ob sich die Lysequote L als Maßeinheit der lytischen Aktivität ersetzen läßt. Wir stellen ihr die Extinktionsdifferenz (E) Normwert - (E) Eigenlysewert gegenüber. Da der mathematische Verteilungstyp dieser beiden Variablen X und Y nicht geklärt ist, benutzen wir ein verteilungsfreies statistisches Verfahren: den sog. Rank Correlation Coefficient (73).

Man ermittelt dazu in beiden Zahlengruppen die Rangplätze der einzelnen Werte nach ihrer Größe. Der Rank Correlation Coefficient ist dann definiert als:

$$r = 1 - \frac{6 \sum d^2}{n(n^2 - 1)} \quad \text{wobei}$$

n = Anzahl der Proben

d = Differenz zwischen den Rangplätzen von
X und Y (73).

Die Korrelationskoeffizienten, die wir im Abschnitt Blutfette-Fibrinolyse angeben, stammen aus einer programmierten multiplen linearen Regressionsanalyse. Sie wurden - wie auch die Ergebnisse aus dem Friedman-Test und dem K-Sample-Friedman-Test - mit einem Computer des ISB im Klinikum Großhadern ermittelt.

IV. ERGEBNISSE

Zu den folgenden Tabellen und Abbildungen eine Vorbemerkung:

Die Hauptversuche sind von 2 - 12 numeriert. Versuch 1 entfällt, da hier die Normplasmen immer erst unmittelbar vor dem nachträglichen Einpipettieren gestoppt wurden. Bei Hauptversuch Nr. 2 reichte die Citratplasmamenge (wegen des hohen Hämatokrits) nicht aus. Deshalb fehlen hier die 8-Std.- und die 18-Std.-Messung der Zeittestung. Versuch 2 ist ansonsten genau wie die übrigen Hauptversuche nach der beschriebenen Methode abgewickelt worden. Sämtliche Meßergebnisse wurden gewertet.

1. Zeittestung

Die Kernfrage dieses Versuchsteils lautet: Kann die Inkubationszeit bei der SFPL verkürzt werden?

Wir vergleichen dazu in Tab. 1/S. 40 die Lysequoten aus der 20-Std.-Messung ($\hat{=}$ Originalmethode der SFPL) mit den Lysequoten der einzelnen Inkubationszeit-Intervalle.

Die Mittelwerte der Lysequoten zeigen, daß die Lyse nach 20 Std. Inkubationszeit deutlich weiter fortgeschritten ist als bei den kürzeren Inkubationszeiten. Abb. 7/S. 41 veranschaulicht dies graphisch.

Die Norm- und Eigenlysewerte, die den unterschiedlichen Lysequoten zugrunde liegen, sind in Abb. 8/S. 42 dargestellt. Hier ist bemerkenswert, daß die (fibrinolysegestoppten) Normwerte nicht auf ihrem anfänglichen Niveau bleiben. Die möglichen Ursachen für den ansteigenden und wiederabfallenden Verlauf dieser Kurve sind auf S. 59 diskutiert.

Zur statistischen Beurteilung der Zeittestung bezogen wir die Lysequoten der verschiedenen Inkubationszeit-Intervalle auf die Lysequoten der 20-Std.-Messung. Wir benutzen dazu den Friedman-Test (siehe auch S. 37).

Wie auch bei den noch folgenden statistischen Übersichten empfiehlt es sich in Tab. 2/S. 43 mit $p = 0,1$ eine relativ hohe Irrtumswahrscheinlichkeit zu wählen, um den sog. β -Fehler (Verkennung eines tatsächlichen Unterschieds zwischen den aufeinander bezogenen Messungen) klein zu halten.

TABELLE 1: Hauptversuche

Extinktionsmessungen der		Versuchs-Nr.												*	**	***
ZEITTESTUNG		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	$\bar{x}$	s	VK %	
8 Std.	Eigenlysewert	-	610	750	705	730	760	710	825	670	725	720	720,5	56,3	7,8 %	
	Normwert	-	650	790	730	750	790	790	845	720	760	760	758,5	52,3	6,9 %	
	Leerwert	390	375	395	380	380	380	395	390	370	390	375	383,6	8,7	2,3 %	
	Lysequote	-	14,5 %	10,1 %	7,1 %	5,4 %	7,3 %	20,2 %	4,4 %	14,3 %	9,5 %	10,4 %	10,3 %	4,8	46,9 %	
10 Std.	Eigenlysewert	740	660	730	685	720	705	670	815	700	705	690	711,9	42,1	5,9 %	
	Normwert	750	690	780	750	760	775	770	875	740	760	740	762,7	44,5	5,8 %	
	Leerwert	390	375	395	380	380	380	395	390	370	390	375	383,6	8,7	2,3 %	
	Lysequote	2,8 %	9,5 %	13,0 %	17,5 %	10,5 %	17,7 %	26,7 %	12,3 %	10,8 %	14,9 %	13,7 %	13,6 %	6,0	44,0 %	
12 Std.	Eigenlysewert	740	670	730	680	710	760	715	800	690	700	685	716,3	38,9	5,4 %	
	Normwert	790	650	785	710	775	775	775	850	760	755	720	758,6	51,5	6,8 %	
	Leerwert	390	375	395	380	380	380	395	390	370	390	375	383,6	8,7	2,3 %	
	Lysequote	12,5 %	0 %	14,1 %	9,1 %	16,4 %	3,8 %	15,8 %	10,9 %	17,9 %	15,1 %	10,1 %	11,4 %	5,5	48,3 %	
14 Std.	Eigenlysewert	740	650	790	715	715	820	730	810	720	805	700	745,0	54,0	7,2 %	
	Normwert	780	675	830	775	820	830	805	855	760	805	810	795,0	48,3	6,1 %	
	Leerwert	390	375	395	380	380	380	395	390	370	390	375	383,6	8,7	2,3 %	
	Lysequote	10,3 %	8,3 %	9,2 %	15,2 %	23,9 %	2,2 %	18,3 %	9,7 %	10,3 %	0 %	25,3 %	12,0 %	8,0	66,3 %	
16 Std.	Eigenlysewert	840	660	760	700	760	790	750	870	660	770	735	754,1	65,7	8,7 %	
	Normwert	860	720	795	745	780	820	760	910	715	820	825	795,4	59,6	7,5 %	
	Leerwert	390	375	395	380	380	380	395	390	370	390	375	383,6	8,7	2,3 %	
	Lysequote	4,2 %	17,4 %	8,7 %	12,3 %	5,0 %	6,8 %	2,7 %	7,7 %	15,9 %	11,6 %	20,0 %	10,2 %	5,7	55,7 %	
18 Std.	Eigenlysewert	-	630	800	660	770	725	705	770	800	710	735	730,5	56,7	7,8 %	
	Normwert	-	660	840	720	790	765	755	820	815	790	790	774,5	53,0	6,8 %	
	Leerwert	415	390	380	365	395	405	390	380	370	390	395	388,6	14,5	3,7 %	
	Lysequote	-	11,1 %	8,7 %	16,9 %	5,1 %	11,1 %	13,7 %	11,4 %	3,4 %	20,0 %	13,9 %	11,5 %	5,0	43,7 %	
20 Std.	Eigenlysewert	670	620	710	615	685	730	650	695	735	680	700	680,9	39,9	5,8 %	
	Normwert	720	665	785	690	780	770	695	810	830	765	790	754,5	53,7	7,1 %	
	Leerwert	415	390	380	365	395	405	390	380	370	390	395	388,6	14,5	3,7 %	
	Lysequote	16,4 %	16,4 %	18,5 %	23,1 %	24,7 %	11,0 %	14,7 %	26,7 %	20,6 %	22,7 %	22,8 %	19,8 %	4,8	24,2 %	
SFP ₁ =Standard-Fibrin- papier, 20 Std. ohne Reagenzien inkubiert		-	550	600	560	585	610	550	560	525	550	605	569,5	28,6	5,0 %	

* = arith. Mittelwert

** = Standardabweichung

*** = Variationskoeffizient

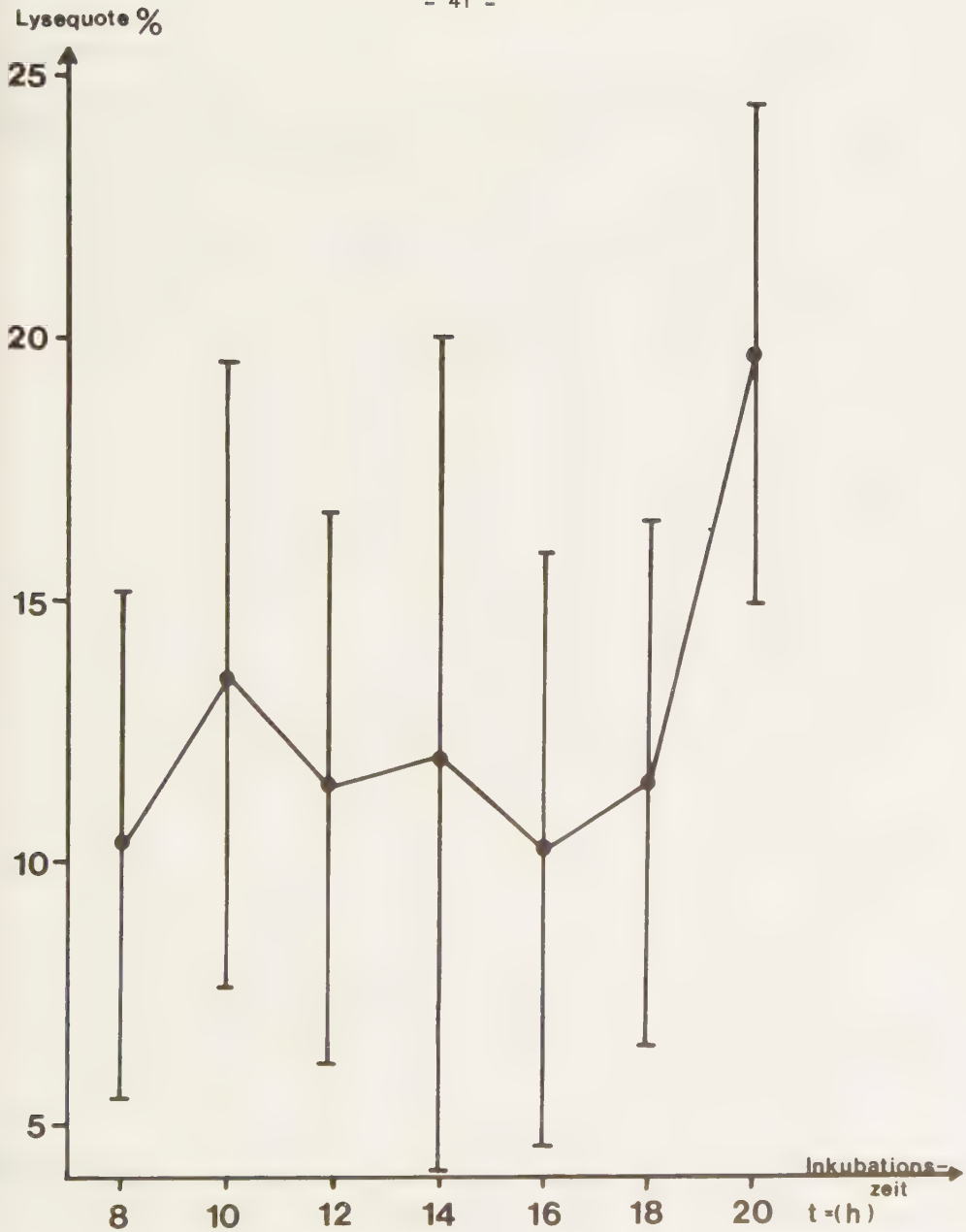


Abb. 7: Mittelwerte der Lysequoten mit Standardabweichungen, (Zeittestung der Hauptversuche).

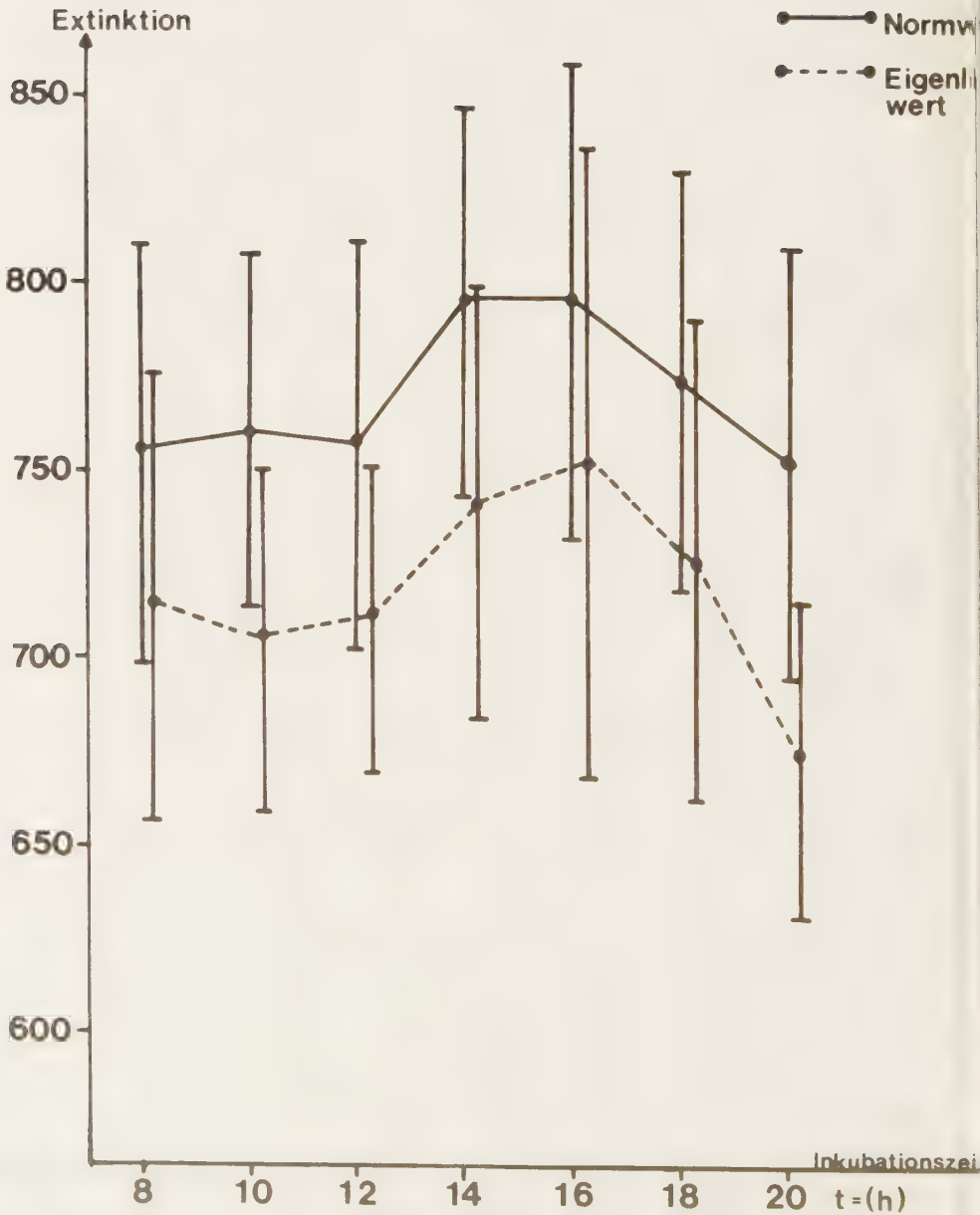


Abb. 8: Mittelwerte der Extinktionen von Norm- und Eigenlysewerten mit Standardabweichungen (Zeittestung der Hauptversuche).

Tab. 2: Friedman-Test; Rangdifferenzen zwischen den Lysequoten aus der 20-Std.-Messung und den Lysequoten der Inkubationszeit-Verkürzungen

Inkubationszeit	18 Std.	16 Std.	14 Std.	12 Std.	10 Std.	8 Std.
20 Std.	26 *	30 **	28 *	26 *	14	30 **



Rangdifferenzen

Kritische Rangdifferenzen für

$p = 0,1 :$ $\geq 26 \quad (*)$

$p = 0,05:$ $\geq 28,5 \quad (**)$

$p = 0,01:$ $\geq 33,4$

Bei $p = 0,1$ weichen demnach alle Meßschritte (Ausnahme: 10-Std.-Messung) signifikant vom 20-Std.-Meßpunkt ab.

Die Inkubationsdauer von 20 Std. soll daher bei der SFPL beibehalten werden.

2. Temperaturtestung

Die Meßdaten aus der Temperaturtestung sind in Tab. 6/S. 46 aufgeführt. Als Bezugsgröße sind die Ergebnisse der 20-Std.-Messung der Zeittestung ($\hat{=}$ Originalmethode) angefügt.

Im Friedman-Test ergeben sich hier folgende Rangdifferenzen:

Tab. 3: Friedman - Test; Rangdifferenz zwischen den Lysequoten aus der 20-Std.-Messung der Zeittestung und den Lysequoten der Temperaturtestung (30° C, Raumtemperatur)

	Inkubationstemperatur	
	30° C	Raumtemperatur
Zeittestung 20-Std.-Mess.	12	11
Kritische Rangdifferenzen für		
p = 0,1	≥ 27,3	
p = 0,05	≥ 29,9	
p = 0,01	≥ 35,0	

Die bei 30° C bzw. bei Raumtemperatur ermittelten Lysequoten weichen demnach nicht signifikant von den mit der Originalmethode gewonnenen Ergebnissen ab (p = 0,1). Trotzdem halten wir es für sinnvoll, die bisherige Inkubationstemperatur von 37° C zu belassen. Diese Empfehlung wird an anderer Stelle diskutiert (s. S. 56).

3. Verdünnungstestung

Die Ergebnisse der Verdünnungstestung sind Tabelle 6/S. 46 zu entnehmen. Auch sie werden im Friedman - Test mit den Meßdaten aus der 20-Std.-Messung der Zeittestung verglichen:

Tab. 4: Friedman - Test; Rangdifferenz zwischen den Lysequoten aus der 20-Std.-Messung der Zeittestung und den Lysequoten der Verdünnungstestung (1 : 10).

	Verdünnung 1 : 10
Zeittestung 20-Std.-Messung	2
Kritische Rangdifferenzen für	
p = 0,1	≥ 27,3
p = 0,05	≥ 29,3
p = 0,01	≥ 35,0

Es besteht somit kein signifikanter Unterschied zwischen den Meßwerten der Originalmethode und den mit der 1 : 10-Verdünnung erhobenen Daten ($p = 0,1$).

Die SFPL kann deshalb künftig mit der im Gerinnungslabor üblichen 1 : 10-Verdünnung betrieben werden.

4. Aktivierungstestung

Tab. 6/S. 46 zeigt die Meßergebnisse. Zum statistischen Vergleich der fibrinolytischen Aktivität von Testplasma mit 50 IE Streptokinase und von Testplasma mit 100 IE Streptokinase eignet sich wiederum der Friedman-Test:

Tab. 5: Friedman-Test; Rangdifferenz zwischen den Lysequoten nach Aktivierung mit 50 und 100 IE Streptokinase

	50 IE Streptokinase
100 IE Streptokinase	2
Kritische Rangdifferenzen für	
$p = 0,1$	$\geq 27,3$
$p = 0,05$	$\geq 29,9$
$p = 0,01$	$\geq 35,0$

Die Aktivierung von Testplasma mit 50 IE Streptokinase unterscheidet sich folglich nicht signifikant von derjenigen mit 100 IE Streptokinase ($p = 0,1$).

Zum graphischen Vergleich zeigt Abb. 9 auf Seite 47 die gemittelten Ergebnisse von Normwert und Eigenlysewert bei den verschiedenen Aktivierungsstufen.

Außerdem sind hier auch die gemittelten Norm- und Eigenlysewerte aus der Temperatur- und der Verdünnungstestung eingetragen. Zu ihrer Beurteilung sind die entsprechenden Werte der Originalmethode mitangeführt.

TABELLE 6: Hauptversuche

Extinktionsmessungen der TESTUNG auf	Versuchs-Nr.												*	**	***
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	12			
Eigenlysewert	660	750	800	800	760	840	760	665	690	695	790	790	746,4	60,6	8,1 %
Normwert	730	830	860	860	800	870	850	705	750	730	800	800	798,6	60,7	7,6 %
Leerwerte	395/385	380/390	355/360	395/375	385/380	385/380	375/380	405/375	370/370	380/375	395/375	395/375	380,2	11,6	3,0 %
Lysequote	20,6 %	18,0 %	11,9 %	12,6 %	9,7 %	6,1 %	19,0 %	12,7 %	15,8 %	9,9 %	2,4 %	2,4 %	12,6 %	5,5	43,8 %
TUR	Eigenlysewert	690	715	860	770	735	805	670	695	690	745	745	738,2	56,7	7,7 %
	Normwert	720	825	880	795	800	840	745	720	720	795	795	789,1	55,8	7,1 %
Raumtemp.	Leerwerte	385/390	365/355	415/420	385/385	385/390	375/410	380/370	385/375	375/395	380/380	380/380	384,5	15,2	3,9 %
	Lysequote	9,0 %	24,7 %	4,3 %	6,1 %	15,8 %	7,8 %	20,3 %	7,3 %	8,9 %	12,0 %	12,0 %	12,4 %	6,7	54,5 %
mittlere Raumtemp.	22,5°C	21,7°C	21,5°C	19,7°C	19,7°C	20,5°C	22,0°C	21,7°C	21,5°C	20,2°C	20,7°C	20,7°C	21,1°C	0,9	4,4 %
VERDÜNNUNG	Eigenlysewert	740	625	645	760	740	670	730	755	685	730	730	710,9	46,6	6,5 %
1:10	Normwert	770	670	710	855	805	880	850	850	790	810	810	806,4	68,2	8,5 %
	Leerwert	415	390	365	395	405	390	380	370	390	395	395	388,6	14,5	3,7 %
	Lysequote	8,4 %	16,1 %	18,8 %	20,6 %	16,2 %	42,9 %	25,5 %	19,8 %	26,2 %	19,3 %	19,3 %	22,0 %	8,8	40,1 %
aktiv.	Lysewert	560	535	520	655	715	615	660	660	610	610	610	622,3	64,5	10,4 %
10 ESK ⁺	Normwert	720	665	690	780	770	695	810	830	765	790	790	754,4	53,7	7,1 %
	Leerwert	415	390	365	395	405	390	380	370	390	395	395	388,6	14,5	3,7 %
	Lysequote	52,5 %	47,3 %	52,3 %	32,5 %	15,1 %	26,2 %	34,9 %	37,0 %	41,3 %	45,6 %	45,6 %	36,8 %	12,6	34,3 %
aktiv.	Lysewert	520	530	520	640	620	535	650	620	600	590	590	588,2	52,4	8,9 %
AKTI- 50ESK	Normwert	720	665	690	780	770	695	810	830	765	790	790	754,5	53,7	7,1 %
VIERUNG	Leerwert	415	390	365	395	405	390	380	370	390	395	395	388,6	14,5	3,7 %
	Lysequote	65,6 %	49,1 %	52,3 %	36,4 %	41,4 %	52,5 %	37,2 %	45,6 %	44,0 %	50,6 %	50,6 %	46,3 %	9,1	19,6 %
aktiv.	Lysewert	530	525	505	650	570	540	635	615	580	600	600	576,8	47,4	8,2 %
100 ESK	Normwert	720	665	690	780	770	695	810	830	765	790	790	754,5	53,7	7,1 %
	Leerwert	415	390	365	395	405	390	380	370	390	395	395	388,6	14,5	3,7 %
	Lysequote	62,3 %	50,9 %	56,9 %	33,4 %	54,8 %	50,8 %	40,7 %	46,7 %	49,3 %	48,1 %	48,1 %	49,2 %	7,8	15,8 %
Zum Vergleich:	Eigenlysewert	670	620	615	685	730	650	695	735	680	700	700	680,9	39,9	5,8 %
20Std.Mess.	Normwert	720	665	690	780	770	695	810	830	765	790	790	754,5	53,7	7,1 %
d. Zeit-	Leerwert	415	390	365	395	405	390	380	370	390	395	395	388,6	14,5	3,7 %
testung	Lysequote	16,4 %	16,4 %	23,1 %	24,7 %	11,0 %	14,7 %	26,7 %	20,6 %	22,7 %	22,8 %	22,8 %	19,8 %	4,8	24,2 %

+ ESK = Einheiten Streptokinase

* = arith. Mittelwert

** = Standardabweichung

*** = Variationskoeffizient

In der folgenden Abbildung sind die gemittelten Norm- und Eigenlyse- (bzw. aktiv. Lyse-)werte aus Tab. 6/S. 46 gegeneinandergestellt. Die vier identischen Normwerte im rechten Teil der Abbildung beruhen darauf, daß für die Aktivierungstestung und den 20-Std.-Meßpunkt der Zeittestung dieselben theoretischen Bedingungen gelten. Es wurde deshalb für beide Testungen nur 1 Normplasma angesetzt (siehe Abb. 2/S.23).

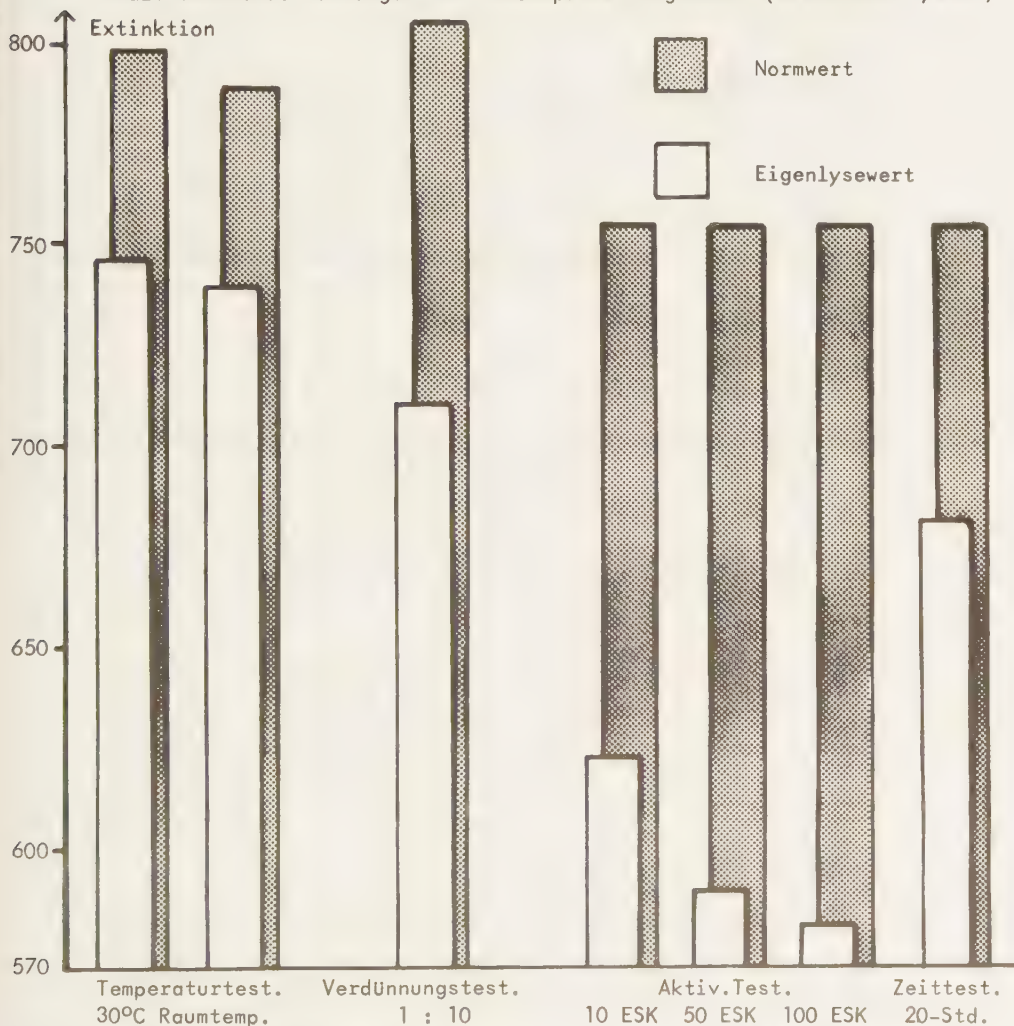


Abb. 9: Mittelwerte der Extinktionen von Norm- und Eigenlysewerten (bzw. aktivierten Lysewerten) aus der Temperatur-, Verdünnungs- und Aktivierungstestung. Als Bezugsgröße daneben die Mittelwerte der 20-Std.-Messung (Zeittestung, Hauptvers.)

5. Blutfette-Fibrinolyse

Tab. 7 zeigt die Serumspiegel von Cholesterin und Triglyceriden der Probanden 2 - 12 aus den Hauptversuchen. Die zugehörigen Lysequoten sind der 20-Std.-Messung der Zeittestung entnommen:

Tab. 7:

Proband	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Cholest. mg/dl	246	252	194	177	283	172	249	203	214	203	170
altersbe- zogener Normbereich bis mg/dl	255	255	230	230	255	230	230	230	230	230	230
Triglyc. mg/dl	203	176	84	125	61	82	68	40	137	100	48
altersbe- zogener Normbereich bis mg/dl	236	236	188	188	236	188	188	188	188	188	188
Lysequote(%)	16,4	16,4	18,5	23,1	24,7	11,0	14,7	26,7	20,6	22,7	22,8

Die Daten aus Tab. 7 wurden einer multiplen linearen Regressionsanalyse unterworfen. Mit den Extinktionsdifferenzen (E) Normwert - (E) Eigenlysewert anstelle der Lysequoten ergab sich folgende Korrelations-Matrix:

	I	II	III
I	1.000		
II	0.275	1.000	
III	-0.141	-0.486	1.000

wobei I = Cholesterinspiegel

II = Triglyceridspiegel und

III = Extinktionsdifferenz (E) Normwert - (E) Eigenlysewert.

Danach ist die lytische Aktivität im Bereich der vorliegenden Daten nicht von den Blutfettspiegeln abhängig.

6. Nachversuch

Die Ergebnisse des Nachversuchs demonstriert Tab. 8/S. 50.

Daraus ist zu ersehen, daß die Normwerte mit der doppelten Konzentration von Gumbix^R (5,0 mg/1 ml Plasma) im Durchschnitt gering über den Normwerten liegen, die mit 2,5 mg Gumbix^R/1 ml Plasma wie in den Hauptversuchen gestoppt sind. Wir gehen darauf noch in der Diskussion ein.

Wie schon genauer erläutert, soll dieser Versuchsteil überprüfen, ob die methodikbedingte Zwischenlagerung des Plasmas bei 4° C in der Zeittestung der Hauptversuche das Versuchsergebnis beeinflußt.

Zur statistischen Kontrolle verglichen wir die Lysequoten der in beiden Versuchsreihen identischen Meßschritte: 8, 14 und 20 Std. Inkubationszeit im K-Sample-Friedman-Test miteinander. Den Lysequoten aus dem Nachversuch liegen dabei die mit 2,5 mg Gumbix^R/1 ml Plasma gestoppten Normwerte zugrunde.

Das Ergebnis

Vergleich des 8-Std.-Meßpunktes: $\chi^2 = 0,733$

Vergleich des 14-Std.-Meßpunktes: $\chi^2 = 0,654$

Vergleich des 20-Std.-Meßpunktes: $\chi^2 = 0,006$

bestätigt die Hypothese, daß wir mit der Plasmazwischenlagerung keine systematischen Fehler bei der Zeittestung der Hauptversuche provozierten.

Abb. 10/S. 51 zeigt den Verlauf der Extinktionsmeßwerte (E) Normwert (2,5 mg Gumbix^R) und (E) Eigenlysewert im Nachversuch. Vergleicht man diese Abbildung mit dem entsprechenden Schaubild der Hauptversuche (Abb. 8/S. 42), dann erscheinen die Normwertschwankungen im Nachversuch ausgeprägter. Die unterschiedlich großen Fallzahlen in beiden Versuchsreihen erklären diesen Effekt.

TABELLE 8: Nachversuch

Extinktionsmessungen der ZEITTESTUNG		P r o b a n d e n			Mittel- werte — x	Standard- abweichung s	Variations- koeffizient VK %	
		1	2	3				
Inkubations- zeit	8 Std.	Eigenlysewert	670	630	640	646,7	20,8	3,2 %
		Normwert	700	665	680	681,7	17,6	2,6 %
		Normwert konz. *	730	675	650	685,0	40,9	6,0 %
		Lysequote	8,9 %	11,5 %	12,6 %	11,0 %	1,9	17,3 %
		16,3 %	14,4 %	3,5 %	11,4 %	6,9	60,8 %	
Inkubations- zeit	11 Std.	Eigenlysewert	940	805	745	830,0	99,9	12,0 %
		Normwert	940	810	775	841,7	86,9	10,3 %
		Normwert konz. *	960	850	815	875,0	75,7	8,6 %
		Lysequote	0 %	1,1 %	6,9 %	2,6 %	3,7	140,0 %
		3,2 %	8,8 %	14,7 %	8,9 %	5,8	64,4 %	
Inkubations- zeit	14 Std.	Eigenlysewert	860	765	725	783,3	69,3	8,8 %
		Normwert	940	795	810	848,3	79,7	9,4 %
		Normwert konz. *	1020	795	830	881,7	121,1	13,7 %
		Lysequote	13,6 %	6,7 %	18,5 %	12,9 %	5,9	45,6 %
		23,8 %	6,7 %	21,8 %	17,4 %	9,3	53,4 %	
Inkubations- zeit	17 Std.	Eigenlysewert	760	805	770	778,3	23,6	3,0 %
		Normwert	940	850	880	890,0	45,8	5,1 %
		Normwert konz. *	950	880	895	908,3	36,9	4,1 %
		Lysequote	31,7 %	9,0 %	21,2 %	20,4 %	11,0	54,1 %
		32,3 %	14,4 %	23,4 %	23,4 %	8,9	38,1 %	
Inkubations- zeit	20 Std.	Eigenlysewert	685	715	710	703,3	16,1	2,3 %
		Normwert	870	775	785	810,0	52,2	6,4 %
		Normwert konz. *	860	720	830	803,3	73,7	9,2 %
		Lysequote	35,9 %	14,3 %	17,4 %	22,5 %	11,7	51,8 %
		34,6 %	1,4 %	25,3 %	20,4 %	17,2	84,0 %	
Leerwerte bei Meßzeitpunkt:		8 Std.	11 Std.	14 Std.	17 Std.	20 Std.		
a) Chromatographiepapier-Leerwert		362	340	350	361	355		
b) SFP _{leer} (ohne Reagenzien inkub.)		545	560	552	590	555		

* Normwert konz.: mit 5 mg Gumbix^R/1 ml Stopplösung gewonnener Normwert.
Damit Errechnung der Lysequote konz.

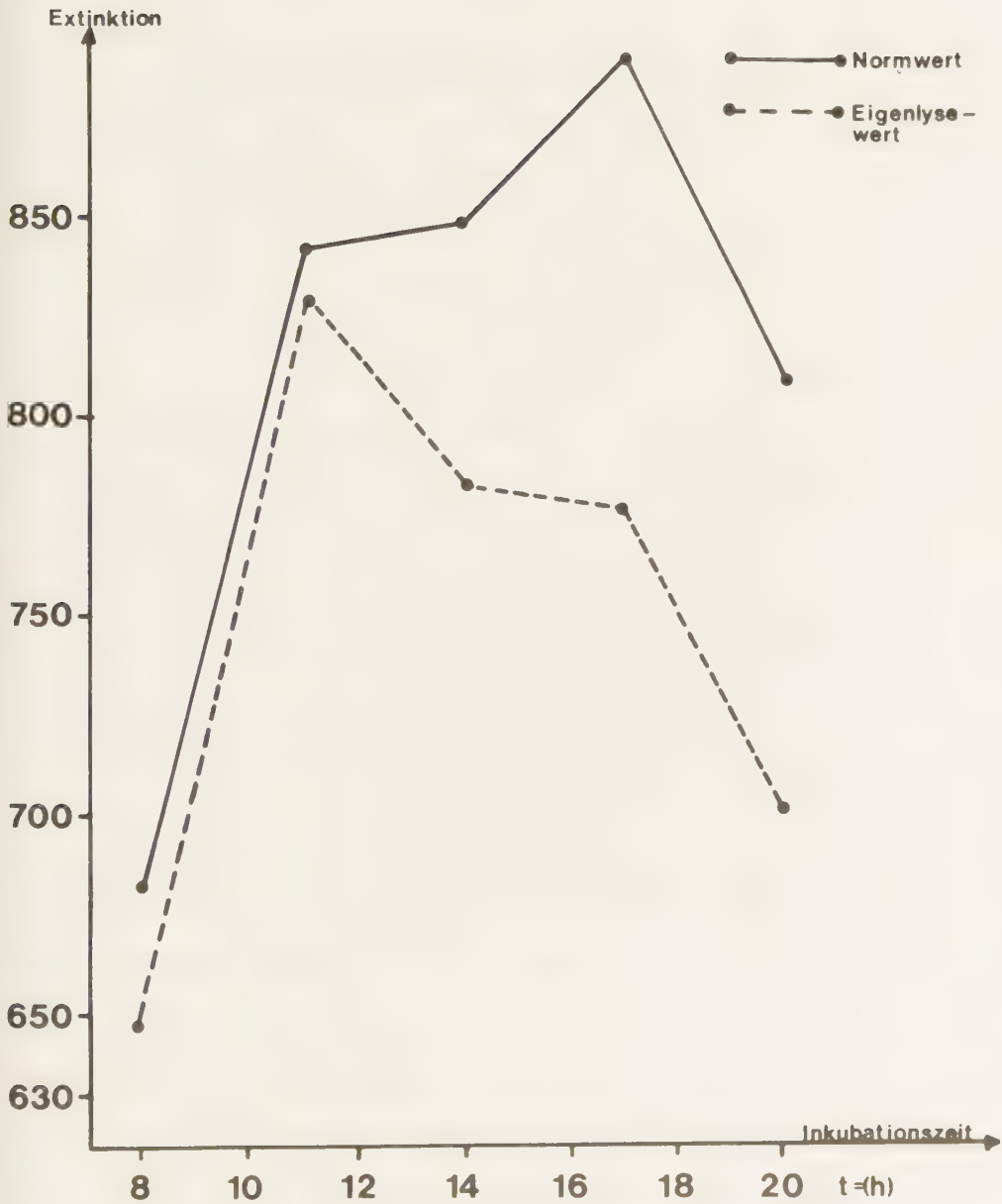


Abb. 10: Mittelwerte der Extinktionen von Normwerten (2,5 mg Gumbix^R) und Eigenlysewerten. Zeittestung, Nachversuch.

7. Zur Maßeinheit der lytischen Aktivität bei der SFPL

Die bisherige Formel zur Bestimmung der Lysequote L lautet:

$$L (\%) = 100 - \frac{(E) \text{ Eigenlysewert} - (E) \text{ Leerwert}}{(E) \text{ Normwert} - (E) \text{ Leerwert}} \times 100.$$

Sie läßt sich durch mathematische Umformung vereinfachen zu:

$$L (\%) = \frac{(E) \text{ Normwert} - (E) \text{ Eigenlysewert}}{(E) \text{ Normwert} - (E) \text{ Leerwert}} \times 100.$$

Diese Formel führt zu identischen Ergebnissen bei geringerem Rechenaufwand.

Noch einfacher wird der Rechenvorgang, wenn man sich allein auf die Extinktionsdifferenz (E) Normwert - (E) Eigenlysewert beschränkt. Die lytische Aktivität läßt sich damit ebenfalls quantitativ erfassen. Dies zeigt sich graphisch, wenn man bei der Zeittestung die Extinktionsdifferenz anstelle der Lysequoten gegen die Inkubationszeit-Intervalle aufträgt, wie in Abb. 11 auf Seite 54 demonstriert. Ein Vergleich mit Abb. 7/S. 41 ergibt, daß beide Kurven nahezu kongruent verlaufen.

Zur rechnerischen Gegenüberstellung verwendeten wir den sog. Rank Correlation Coefficient (73). Wir bezogen hier die Lysequoten aus der 20-Std.-Messung der Zeittestung (Tab. 1/S. 40) auf die entsprechenden Extinktionsdifferenzen (Tab. 9/S. 53).

Dabei fanden wir einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,88$. Dieses Ergebnis berechtigt dazu, die Extinktionsdifferenz (E) Normwert - (E) Eigenlysewert bei der SFPL als alternative Meßgröße der lytischen Aktivität neben die Lysequote (%) zu setzen. Somit läßt sich Tab. 9/S. 53 ersatzweise zu Tab. 1 auf Seite 40 aufstellen.

Zusätzliche Überlegungen, die sich hieraus ergeben, sind auf S. 62 zusammengefaßt.

Extinktionsmessungen der ZEITTESTUNG		Versuchs-Nr.										*	**	***
		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	s	VK %
8 Std. Extinktionsdifferenz: Normw. - Eigenly.	Normwert	-	650	790	730	750	790	790	845	720	760	760	52,7	6,9 %
	Eigenlysewert	-	610	750	705	730	760	710	825	670	725	720	56,3	7,8 %
	Extinktionsdifferenz:													
10 Std. Extinktionsdifferenz: Normw. - Eigenly.	Normwert	-	40	40	25	20	30	80	20	50	35	40	17,7	46,5 %
	Eigenlysewert	750	690	780	750	760	775	770	875	740	760	740	44,5	5,8 %
	Extinktionsdifferenz:	740	660	730	685	720	705	670	815	700	705	690	42,1	5,9 %
12 Std. Extinktionsdifferenz: Normw. - Eigenly.	Normwert	10	30	50	65	40	70	100	60	40	55	50	23,2	44,9 %
	Eigenlysewert	790	650	785	710	775	775	775	850	760	755	720	51,5	6,8 %
	Extinktionsdifferenz:	740	670	730	680	710	760	715	800	690	700	685	38,9	5,4 %
14 Std. Extinktionsdifferenz: Normw. - Eigenly.	Normwert	50	70	55	30	65	15	60	50	70	55	35	21,8	49,4 %
	Eigenlysewert	780	675	830	775	820	830	805	855	760	805	810	48,3	6,1 %
	Extinktionsdifferenz:	740	650	790	715	715	820	730	810	720	805	700	54,0	7,2 %
16 Std. Extinktionsdifferenz: Normw. - Eigenly.	Normwert	40	25	40	60	105	10	75	45	40	0	110	35,2	70,4 %
	Eigenlysewert	860	720	795	745	780	820	760	910	715	820	825	59,6	7,5 %
	Extinktionsdifferenz:	840	660	760	700	760	790	750	870	660	770	735	65,7	8,7 %
18 Std. Extinktionsdifferenz: Normw. - Eigenly.	Normwert	20	60	35	45	20	30	10	40	55	50	90	22,5	54,4 %
	Eigenlysewert	-	660	840	720	790	765	755	820	815	790	790	53,0	6,8 %
	Extinktionsdifferenz:	-	630	800	660	770	725	705	770	800	710	735	56,7	7,8 %
20 Std. Extinktionsdifferenz: Normw. - Eigenly.	Normwert	-	30	40	60	20	40	50	50	15	80	55	19,4	44,1 %
	Eigenlysewert	720	665	785	690	780	770	695	810	830	765	790	53,7	7,1 %
	Extinktionsdifferenz:	670	620	710	615	685	730	650	695	735	680	700	39,9	5,8 %
	Normw. - Eigenly.	50	45	75	75	95	40	45	115	95	85	90	25,2	34,2 %

* = orith. Mittelwert ** = Standardabweichung *** = Variationskoeffizient

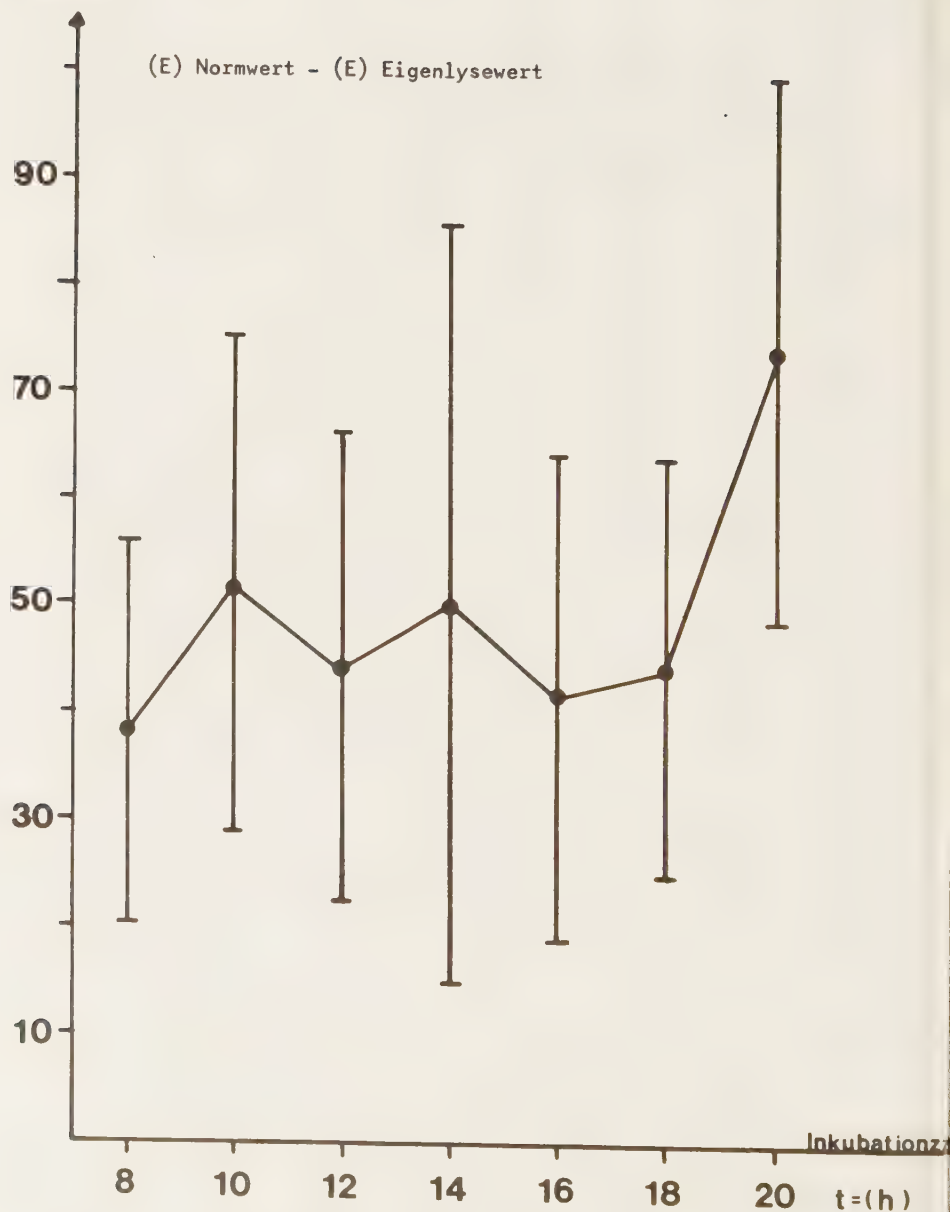


Abb. 11: Mittelwerte der Extinktionsdifferenzen (E) Normwert - (E) Eigenlysewert mit Standardabweichungen (Zeittestung der Hauptversuche).

V. DISKUSSION

A 1. Zeittestung

Unsere Arbeitshypothese zur Zeittestung lautete:

Die Verkürzung der Inkubationszeit beeinflusst das Ergebnis. Offen blieb, von welchem Zeitpunkt an ein signifikanter Unterschied gegenüber der SFPL-Originalmethode auftreten würde. Wir erwarteten, daß die Lysequotenkurve nach dem Prinzip einer Enzym/Substrat-Beziehung zeitabhängig ansteigen und vor dem 20 Std.-Meßbereich in ein Plateau auslaufen würde.

Stattdessen fanden wir die in Abb. 7/S. 41 dargestellten Verhältnisse. Nach geringen Schwankungen zwischen 8 und 18 Std. Inkubationszeit steigt die Lysequote mit dem 20 Std.-Meßwert deutlich an. Ein abschließendes Plateau der zeitabhängigen Lysequotenkurve ist innerhalb des untersuchten Inkubationszeitraumes nicht abzusehen. Die Frage, bei welcher Inkubationszeitverkürzung ein signifikanter Unterschied zum Plateau-Wert auftritt, entfällt damit.

Der Kurvenverlauf läßt dagegen vermuten, daß die Lysequote auch über eine Inkubationszeit von 20 Std. hinaus noch ansteigt. Das heißt: Die Originalmethode der SFPL erfaßt wahrscheinlich auch bei 20 Std. Inkubationszeit noch nicht das gesamte fibrinolytische Potential der Testflüssigkeit.

Bei künftigen Zeittestungen ist es also notwendig, die Inkubationsdauer auch über 20 Std. hinaus zu variieren. Daneben muß noch der Bereich zwischen 0 und 8 Std. Inkubationszeit untersucht werden. Dies könnte die Frage klären, wie die relativ gleichbleibenden Lysequoten zwischen 8 und 18 Std. Inkubationszeit zustande kommen. Als vorläufige Erklärung vermuten wir einen initialen "Lyseschub", der mit dem Wirkungseintritt von Progressivinhibitoren (z. B. α_1 -Antitrypsin) abgefangen wird.

Solange nicht sicher feststeht, von welcher Inkubationszeit an das gesamte fibrinolytische Potential einer Testflüssigkeit mit der SFPL erfaßt wird, sollte die bisherige 20 Std.-Vorschrift der Originalmethode beibehalten werden. Dies gilt auch für die derzeit laufenden Versuche mit der SFPL.

2. Temperaturtestung

Hierzu ein Hinweis, der auch für die Verdünnungstestung gilt: Da wir interindividuelle Versuche durchführten, liegen die Ergebnisse entsprechend der natürlichen Streubreite verteilt. Diese Variabilität geht zusammen mit den Abweichungen, die durch die Modifikation der Originalmethode bedingt sind, in die statistische Auswertung ein.

Obwohl wir eine möglichst gleichförmige Probandengruppe auswählten, erscheint das statistische Raster wegen der großen Bandbreite der Einzelergebnisse relativ grob. So ist im Friedman-Test bei $p = 0,1$ kein signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen der Temperaturtestung und den Meßwerten der Originalmethode festzustellen. Vergleicht man jedoch die Werte innerhalb einer Versuchsnummer, dann beobachtet man meistens, daß die Lysequote mit der Verminderung der Inkubationstemperatur auf 30°C abfällt. Dies schlägt sich auch in den arithmetischen Mittelwerten der Lysequoten nieder (Originalmethode 19,8 %, 30°C -Testung 12,6 %).

Es fällt auf, daß die weitere Temperatursenkung auf Raumtemperatur praktisch keinen zusätzlichen Effekt mehr hat. Die erste kritische Temperaturschwelle liegt also zwischen 37°C und 30°C . Trotz der statistischen Bestätigung unserer Fragestellung zur Temperaturtestung halten wir es nach diesen Überlegungen für sinnvoll, die bisherige Inkubationstemperatur von 37°C zu belassen.

3. Verdünnungstestung

Dieser Versuchsteil entsprach unseren Erwartungen. Mit einer gewissen Einschränkung der statistischen Aussage (siehe oben) ergibt sich aus unseren Ergebnissen, daß die SFPL auch bei der Plasmaverdünnung 1 : 10 durchgeführt werden kann. Dafür sprechen die minimale Rangdifferenz im Friedman-Test (siehe Tab. 4/S. 44) und die sehr nahe beieinander liegenden Ergebnisse innerhalb der einzelnen Versuche (siehe Tab. 6/S. 46).

4. Aktivierungstestung

Nach den Ergebnissen früherer Versuche ist die fibrinolytische Aktivität bei der SFPL mit mehr als 100 IE Streptokinase praktisch nicht mehr zu steigern (22).

Unsere Ergebnisse zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen der Anregung mit 50 und der mit 100 IE Streptokinase pro 1 ml Plasma. Folglich genügen bei der SFPL bereits 50 IE Streptokinase, um die fibrinolytische Aktivität bei 20 Std. Inkubationszeit maximal zu steigern.

Bei vier Versuchen liegen die mit 100 IE erzielten Lysequoten geringfügig unter den 50 IE-Werten (siehe Tab. 6/S. 46). Die Differenzen bewegen sich dabei jedoch innerhalb der Fehlerbreite unserer Methode. Ein Lyse-Hemmungseffekt (22) läßt sich hieraus noch nicht ableiten.

Eine Veröffentlichung von Yasukouchi et al. (76) legt jedoch nahe, daß ein solcher Lyse-Hemmungseffekt in vitro unter bestimmten experimentellen Bedingungen existiert. Nach ihren Untersuchungen mit der auf S. 15 beschriebenen Methode tritt dieser Effekt aber erst bei Aktivierungen oberhalb einer Konzentration von 1000 Christensen units Streptokinase auf (Reaktionslösung: 0,3 ml Euglobulin + 0,02 ml Streptokinase verschiedener Konz.). Der bisher nicht erklärbare Hemmungseffekt ist außerdem nur zu beobachten, wenn plasminogen-freies Fibrin - wie bei unserem Verfahren - benutzt wird (75). Demnach besteht derzeit kein Anlaß, einen entsprechenden Effekt unter Streptokinase auch in vivo anzunehmen.

5. Blutfette-Fibrinolyse

Nach dem von Zöllner (76) angegebenen Normalwertbereich des Serumcholesterinspiegels befinden sich 2 Probanden im pathologischen Bereich (Tab. 7/S. 48). Bei 2 Versuchspersonen wurden grenzwertige Serumcholesterinspiegel festgestellt. Drei weitere Messungen liegen im oberen Normbereich.

Die Serumtriglyceridspiegel waren ohne pathologischen Befund (Normalwertbereich nach Henze et al., 33). Beide Einstufungen beziehen sich allerdings nur auf eine einmalige Messung nach 12stündiger Nüchternperiode.

Eine systematische Korrelation zwischen diesen Untersuchungsgrößen und der fibrinolytischen Aktivität war nicht zu erkennen (Korrelationsmatrix S. 48). Es bleibt zu klären, ob Untersuchungen an einer größeren Anzahl von Patienten mit ausgeprägten Fettstoffwechselstörungen hier eine Gesetzmäßigkeit aufdecken.

6. Nachversuch

Wie aus Tab. 8/S. 50 hervorgeht, resultieren bei 5 mg Gumbix^R im Normplasma durchschnittlich höhere Lysequoten als bei 2,5 mg Gumbix^R. (Ausnahme: 20 Std.-Messung). Das hieße demnach: verstärkte fibrinolytische Aktivität unter vermehrter Fibrinolysehemmstoff-Konzentration!

Bei genauerer Betrachtung der zugrunde liegenden Meßwerte wird jedoch offensichtlich, daß in Wirklichkeit die erhöhten Normwerte unter der doppelten Gumbix-Konzentration für die höheren Lysequoten verantwortlich sind. Höhere Normwerte bedeuten aber verstärkte Fibrinolysehemmung.

Dieser Widerspruch ist zunächst nicht erklärbar. Nach den Dosierungsrichtlinien des Herstellers können wir nämlich davon ausgehen, daß die fibrinolytische Aktivität in den Normplasmen bereits mit 2,5 mg Gumbix^R vollständig blockiert ist (36). Bei der Zeittestung des Hauptversuchs konnten wir aber ebenfalls Normwertschwankungen beobachten. Dies macht weitere Überlegungen notwendig:

B Problem der Normwertschwankungen

Die Normwertveränderungen im Rahmen der Zeittestung demonstriert Abb. 8/S. 42. Trotz gleichbleibender Gumbix^R-Konzentration verändern sich die Normwerte zwischen 12 und 20 Std. Inkubationszeit erheblich.

Bei der Suche nach der Ursache dieses Phänomens fielen die SFP_{leer}-Papiere aus Box I auf. Ihre photometrische Auswertung brachte ein ähnliches Ergebnis wie bei früheren Untersuchungen (Scholle, 61, Sipos, 59, Weber, 68). Die SFP_{leer}-Extinktionswerte lagen auffallend niedriger als die Meßergebnisse der im Plasma inkubierten Papiere (siehe Tab. 1/S. 40).

Theoretisch müßten sich Normwert und SFP_{leer}-Wert in derselben Größenordnung bewegen, da in beiden Fällen die Fibrinschicht auf den Papieren unberührt bleibt. Beim Eigenlysewert sollte man dagegen erwarten, daß er wegen der teilweisen Abdaauung des Fibrinbelages niedriger liegt. Nach unseren Ergebnissen sind aber Norm- und Eigenlysewerte deutlich größer als die Meßergebnisse der SFP_{leer}-Papiere. Dies läßt nur einen Schluß zu:

Die in Plasma inkubierten Papiere weisen gegenüber den SFP_{leer} einen zusätzlichen Proteinbelag auf.

Diese Folgerung ist dadurch begründet, daß der Fibrin- (=Protein-) belag auf den SFP's mit derselben Methode angefärbt wird, mit der Proteine im Rahmen der Elektrophorese quantitativ erfaßt werden. Nach den Untersuchungen von Großmann und Hannig (24) ist dabei die Farbstoffaufnahme dem Proteingehalt proportional. Demnach korreliert auch die Farbstoffmenge, die sich aus den SFP's eluieren läßt, direkt mit der Proteinmenge auf diesen Papieren.

Während der Inkubationszeit lagern sich folglich Plasmaproteine, die noch nicht näher klassifizierbar sind, an die Fibrinschicht der SFP's an. Daß es sich dabei nicht einfach nur um Plasminogen handeln kann, geht aus dem Wirkungsmechanismus von Gumbix^R hervor.

Er wird unten genauer erläutert.

Wie Abb. 8/S. 42 zeigt, liegen die gemittelten Norm- und Eigenlysewerte bereits bei der 8 Std.-Messung erheblich über dem Durchschnitt der SFP_{leer} ($\bar{E} = 569,5$). Das bedeutet, daß schon zu diesem Zeitpunkt größere Mengen von Hämoproteinen auf der Fibrinschicht der SFP's vorhanden sind. Eine zusätzliche Proteinadsorption scheint danach im Bereich von 12 - 14 Std. Inkubationszeit stattzufinden.

Das Wiederabsinken der Eigenlysewerte bei Annäherung an die 20 Std.-Messung ist mit der zunehmenden Fibrinolyse erklärbar, unter der ein Teil des Fibrinbelages abgedaut wird. Nicht ohne weiteres verständlich ist jedoch, daß hier auch die Normwerte absinken. Als Ursache kommen in Frage:

- a) die rein physikalische Desaggregation der angelagerten Plasmaproteine,
- b) der hämoproteolytische Abbau dieser Substanzen
- c) und - paradoxerweise - auch Fibrinolyse.

Den erstgenannten Mechanismus halten wir für unwahrscheinlich, da die Plasmaproteine immerhin so stabil an die Fibrinschicht angelagert sind, daß sie auch der 80minütigen Wässerung zu Beginn des Automatik-Arbeitsganges standhalten. Wichtiger erscheinen uns die anderen beiden Punkte. Hierzu einige Erläuterungen:

Fibrin stimuliert die Aktivierung von Plasminogen über den Gewebe-Aktivator (Wallén u. Wimann, 67). In Gegenwart von 3 mM EACA geht dieser Effekt jedoch völlig verloren. Ursache dafür ist die Trennung des Fibrin/Plasminogen-Komplexes durch EACA (70). Substanzen dieses Typs (also auch Gumbix^R = PAMBA) bilden ihrerseits mit Plasminogen einen Komplex, der bei diesem Molekül zu einer nachweisli-

chen Konformationsänderung führt (Alkjaersig et al, 2, Brockway u. Castellino, 11). Daraus resultiert eine erhöhte Aktivierungsrate von Plasminogen (Clays u. Vermylen, 13, Thorsen, Kok und Astrup, 65, Wallén u. Wiman, 67).

Dieser Effekt ist konzentrationsabhängig. Nach den Versuchen von Thorsen et al. (65) ist er maximal ausgeprägt bei $10^{-3}M$ EACA in der Reaktionslösung. Bei kleineren oder größeren Konzentrationen ist ein Anstieg bzw. Wiederanstieg der Lysehemmung zu beobachten. Eine vollständige Blockierung der Lyse erreichten Thorsen et al. selbst mit extrem hohen Konzentrationen von EACA (0,1 M) nicht. Trotzdem sind diese Substanzen in vivo als wirksame Antifibrinolytika bekannt. Wiman und Wallén kommen nach ihren Untersuchungen zu dem Schluß, daß Plasminogen normalerweise über die sog. lysine-binding-site an Fibrin gebunden wird. Die lysine-binding-site ist aber auch der Molekülbereich, an dem Plasminogen und die synthetischen Antifibrinolytika miteinander reagieren. Damit ist erklärt, weshalb diese Substanzen in vivo die Fibrinolyse hemmen: Wegen des 30fach größeren Antiplasmin-Potentials (Witt, 71) kann Plasminogen in vivo nur dann zu fibrinolytisch wirksamen Plasmin umgewandelt werden, wenn dies in unmittelbarer räumlicher Beziehung mit Fibrin geschieht (70). Eben dieser Zusammenhang wird aber wie beschrieben durch die synthetischen Antifibrinolytika aufgelöst.

Innerhalb unseres Normplasma-Versuchsmilieus ist nach diesen neuen Erkenntnissen durchaus zu vermuten, daß mit zunehmender Inkubationsdauer Plasmin und Fibrin in Berührung kommen; um so mehr, als das unter PAMBA eventuell verstärkt gebildete Plasmin ebenfalls mit weiteren Hämoproteinen auf den SFP's abgelagert werden kann. Daß in diesem Konglomerat von Proteinen die Antiplasminine wahrscheinlich weniger wirksam werden, erscheint plausibel.

Plasmin ist nicht streng substratspezifisch (s. S. 4). Es liegt deshalb nahe, daß sich unter den angelagerten Hämoproteinen auf den SFP's Gruppen befinden, die durch Plasmin hydrolysiert werden können.

Auch wenn man davon ausgeht, daß die Plasminwirkung infolge der Antiplasminine doch keine größeren Ausmaße annehmen kann, bleiben zumindest andere Serinesterasen wie Trypsin, Chymotrypsin und Plasma-Kallikrein für einen hämoproteolytischen Effekt übrig. Beide Mechanismen (Hämoproteolyse durch Plasmin oder andere Serinesterasen) sind demnach auch an den SFP's der Testplasmen denkbar.

Daß solche spontanen proteolytischen Prozesse möglich sind, zeigt sich z. B. bei Radioimmunoassays von Insulin und Glucagon, wo unerwünschter hämoproteolytischer Abbau in Serum- oder Plasmaproben das Ergebnis empfindlich stören kann. Die Proteolyse wird hier durch Proteinasen-Inhibitoren vom Typ Aprotinin (z. B. Trasylol^R) wirkungsvoll gehemmt.

Mit diesen Substanzen als Fibrino- bzw. Hämoproteolyse-Inhibitoren ließe sich auch einfach differenzieren, inwieweit die fragliche, rein physikalische Wiederablösung von Hämoproteinen ins Gewicht fällt.

Im Nachversuch wurden die SFP_{leer}-Papiere ebenfalls mitbestimmt. Die Norm- und Eigenlysewert-Extinktionsmessungen zeigen, daß auch hier die Hämoproteinanlagerung in gleicher Größenordnung stattfindet. Unter der doppelten Gumbix^R-Konzentration erhöht sich im Durchschnitt der entsprechende Normwert. Das heißt: die veränderten physiko-chemischen Bedingungen im Normplasma mit hoher Fibrinolysehemmstoff-Konzentration begünstigen eine zusätzliche Hämoproteinanlagerung.

C Schlußfolgerungen

Die anfänglichen Hoffnungen auf einfachere Handhabung der SFPL haben sich nur zum Teil erfüllt (Verdünnungstestung). Unerwartete Schwierigkeiten sind dafür zutage getreten:

Unsere Ergebnisse zeigen, daß eine stabile Proteinanlagerung an die SFP's bei den Hauptversuchen 3 - 12 stattfindet (bei Versuch 2 wurde kein SFP_{leer} bestimmt). Auch bei allen Ansätzen des Nachversuchs ist der Effekt nachzuweisen.

Wie erläutert, können wir unter diesem Aspekt nicht mehr davon ausgehen, daß Plasmin - ob spontan oder mit Streptokinase aktiviert - ausschließlich das standardisierte Rinderfibrin auf den SFP's hydrolysiert. Höchstwahrscheinlich wirkt Plasmin daneben auch hämoproteolytisch.

Vorläufig ist noch ungeklärt, ob außer Plasmin auch noch andere Serinesterasen an der Hämoproteolyse beteiligt sind. Die Konsequenzen, die sich aus dem neuen Blickwinkel für die Interpretation der Extinktionswerte ergeben, sind in Tab. 10/S. 64 und in Abb. 12/S. 64 dargelegt. Danach sollte man bei der SFPL bis zur Klärung des jeweiligen Anteils von Fibrinolyse und Hämoproteolyse am Gesamtergebnis nur von "Lysemessung" sprechen.

Eine weitere Folgerung betrifft die Formel für die Berechnung der Lysequote: Bei der Einstufung der lytischen Aktivität als Lysequote von 0 % - 100 % war man davon ausgegangen, daß die Fibrinschicht auf den SFP's das alleinige Substrat darstellt. Es erscheint jetzt fragwürdig, an der Prozentualisierung des Ergebnisses festzuhalten. Hier bietet sich die Extinktionsdifferenz (E) Normwert - (E) Eigenlysewert, bzw. (E) aktiv. Lysewert an. Sie korreliert sehr gut mit der entsprechenden Lysequote ($r = 0,88$) und erfordert einen nur minimalen Rechenaufwand. Die Extinktionsdifferenz hat den Vorteil, daß damit auch mathematisch normalverteilte Ergebnisse möglich sind (im Gegensatz zur Prozentualisierten Lysequote). So kann man auf empfindlichere statistische Testverfahren zurückgreifen. Beim Vergleich der Variationskoeffizienten aus Tab. 1/S. 40 und Tab. 9/S. 53 fällt auf, daß die Extinktionsdifferenzen meist etwas stärker streuen als die Lysequoten. Ob dies nachteilig ist, sei dahingestellt; die größere Sensitivität der Extinktionsdifferenz erlaubt jedenfalls ein genaueres Arbeiten bei nur geringer lytischer Aktivität.

Ein eindeutiger Nachteil der Extinktionsdifferenz als Meßgröße liegt jedoch darin, daß die Chromatographiepapier-Leerwerte nicht - wie für die Formel zur Errechnung der Lysequote - zwangsläufig mitbestimmt werden. Apparative Fehler (z. B. verstopfte Ventile oder verunreinigte Reagenzien im Automatik-Arbeitsgang) kann man an auffälligen Chromatographie-Leerwertpapieren leicht erkennen. Dieser Vorteil ist aber einfach auf die Extinktionsdifferenz zu übertragen: man läßt grundsätzlich ein Chromatographie-Leerwertpapier im Automatik-Arbeitsgang mitlaufen. Seinen Extinktionswert vergleicht man mit allen bis dahin gemessenen Leerwerten einer Charge. Ist der Abstand zum arithmetischen Mittelwert dieser Meßwertreihe größer als 10 %, liegt ein labortech-nischer Fehler vor (in Anlehnung an die bei Dulce, 17, beschriebene Richtigkeitskontrolle).

Für zukünftige Untersucher ergeben sich folgende Empfehlungen:

- a) Bei der SFPL sollen synthetische Antifibrinolytika nicht mehr als alleinige Fibrinolyse-Inhibitoren verwendet werden.

Nach Markwardt (46) läßt sich in vivo durch die Kombination von Proteinasen-Inhibitoren vom Trasylol^R-Typ mit synthetischen Antifibrinolytika (z. B. Gumbix^R) ein überadditiver Fibrinolyse-Hemmefekt erzielen. In einer Versuchsreihe könnte dies auch in

vitro an der SFPL überprüft werden. Es ist dabei empfehlenswert, in jedem Ansatz ein SFP_{leer}-Papier mitzubestimmen, um den wahrscheinlich unterschiedlichen Einfluß der verschiedenen Hemmlösungen auf die Proteinadsorption an die SFP's erfassen zu können.

- b) In einer weiteren Zeittestung ist der Bereich zwischen 0 bis 8 Std. und zwischen 20 bis möglichst 30 Std. Inkubationszeit zu untersuchen.

Die Zeittestung sollte mit Nativ-(Citrat-)plasma und parallel dazu mit aktiviertem Plasma (50 IE Streptokinase) erfolgen. Vielleicht ergibt sich daraus die Möglichkeit, wenigstens bei Testungen mit aktiviertem Plasma die Inkubationszeit auf ein bequemes Ausmaß zu reduzieren.

Es ist zu diskutieren, ob man diese Untersuchungen nicht aus einer größeren Portion von Mischplasma gesunder Versuchspersonen bestreiten soll. Die biologische Streubreite wäre damit als Störfaktor ausgeschaltet.

Im Rahmen dieser Zeittestung könnte man nach der Inkubation einen Teil der SFP's chemisch so aufbereiten, daß die gesamte Proteinschicht entfernt wird. Die Weiterleitung zur chemischen Analyse hilft

- c) die Hämoproteine zu identifizieren, die an die SFP's angelagert sind.

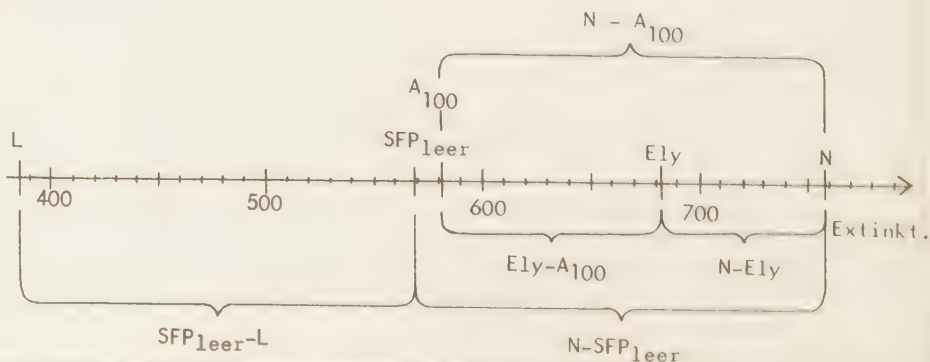
Dies könnte neue Gesichtspunkte für die Frage bringen, welchen Anteil die Hämoproteolyse am Gesamtergebnis der Lysemessung hat.

Tab. 10: Folgerungen aus den Ergebnissen der SFP_{leer} (Tab. 1/S. 40).
Extinktionsmeßwerte aus den Hauptversuchen Nr. 3 - 12:

Legende: SFP_{leer} = Standardfibrinpapier ohne Reagenzien inkubiert
L = Chromatographiepapier - Leerwert
N = Normwert aus Zeittestung (20-Std.-Messung, gilt auch für Aktivierungstestung)
Ely = Eigenlysewert aus Zeittestung (20-Std.-Messung)
A₁₀₀ = aktivierter Lysewert (100 IE Streptokinase)

Extinktions- differenzen	arithmet. Mittel- wert $\bar{x}$	Extinktionsdifferenz ist quantitativer Ausdruck für:
SFP _{leer} -L	183,5	potentiell lysierbares Rinderfibrin auf den SFP's
N - SFP _{leer}	188,5	aus dem Plasma an die SFP's ange- lagerte Hämoproteine
N - Ely	76	spontane Proteolyse; setzt sich aus sp.Fibrinolyse und aus sp.Hämopro- teolyse zusammen, jeweiliger Anteil noch ungeklärt
N - A ₁₀₀	176,5	aktivierte Proteolyse; setzt sich aus aktiv. Fibrinolyse u. aus aktiv. Hämopro- teolyse (durch Plasmin) zusammen; jeweiliger Anteil noch ungeklärt
Ely - A ₁₀₀	100,5	durch 100 IE Streptokinase verursach- te Steigerung der proteolytischen Aktivität

Abb. 12: Extinktionsskala mit den gemittelten Meßwerten, die den obigen Differenzen zugrunde liegen:



VI. ZUSAMMENFASSUNG

Mit Hilfe von 11 jungen, gesunden Probanden untersuchten wir für die Standardfibrinpapier-Lysebestimmung (SFPL) nach Goossens folgende Fragestellungen:

- 1.) Ist eine Verkürzung der Inkubationsdauer möglich?
- 2.) Kann man auch bei Raumtemperatur inkubieren?
- 3.) Genügt die im Gerinnungslabor übliche Citratblutverdünnung von 1 : 10?
- 4.) Bestehen Unterschiede in der Aktivierbarkeit des Testplasmas mit 50 und mit 100 IE Streptokinase?

Ergebnisse:

- ad 1.) Eine Verkürzung der Inkubationsdauer von derzeit 20 Std. ist nicht möglich. Unsere Untersuchungen zeigen vielmehr, daß die Lyse wahrscheinlich über 20 Std. Inkubationszeit hinaus noch fortschreitet.
- ad 2.) Die Meßergebnisse legen es nahe, die Inkubationstemperatur bei 37° C zu belassen.
- ad 3.) Die bisherige Citratblutverdünnung von 1 : 5 ist nicht notwendig. Zukünftig kann man auch für die SFPL die 1 : 10-Verdünnung verwenden.
- ad 4.) Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen der Aktivierung mit 50 und der mit 100 IE Streptokinase. Bei der SFPL ist die maximale Lyseaktivierung bereits mit 50 IE Streptokinase zu erreichen.

Diese Ergebnisse wurden mit Frischplasma gewonnen. Nur bei den Untersuchungen zur Verkürzung der Inkubationsdauer war eine Zwischenlagerung des Plasmas bei 4° C (bis zu 12 Std.) notwendig.

In einem Nachversuch konnten wir feststellen, daß diese Plasmalagerung die Lysemessungen nicht beeinflußt.

Zusätzlich setzten wir die individuellen Serumspiegel von Cholesterin und Triglyceriden mit den jeweiligen Lysequoten in Beziehung: Die weitgehend normalen Blutfettspiegel ließen keinen gesetzmäßigen Zusammenhang mit der lytischen Aktivität erkennen.

II Darüber hinaus kamen wir an Hand unserer Meßdaten zu diesen Schlußfolgerungen:

- a) Während der Inkubationszeit lagern sich Hämoproteine stabil an die Standardfibrinpapiere an. Ihre Proteolyse kann zusammen mit der Fibrinolyse in das Ergebnis eingehen. Bis auf weiteres sollte man deshalb bei der SFPL nur von "Lysemessung" sprechen.
- b) Die Lysehemmung mit synthetischen Antifibrinolytika reicht bei der SFPL nicht aus. Als Ersatz sind Proteinase-Inhibitoren vom Aprotinin-Typ bzw. eine Kombination dieser Substanzen mit synthetischen Antifibrinolytika zu untersuchen.

III Wir vereinfachten außerdem die bisherige Lysequotenformel zu:

$$L (\%) = \frac{(E) \text{ Normwert} - (E) \text{ Eigenlysewert}}{(E) \text{ Normwert} - (E) \text{ Leerwert}} \times 100$$

und diskutierten die Frage, ob nicht allein die Extinktionsdifferenz $(E) \text{ Normwert} - (E) \text{ Eigenlysewert}$ als Maß für die lytische Aktivität ausreicht. Sie korreliert bei $r = 0,88$ mit der Lysequote.

IV Zu unserer Untersuchung benutzten wir erstmals das Lysegerät 78. Es steuert Wässerung, Färbung und Wiederentfärbung der Standardfibrinpapiere in einem vollautomatischen Arbeitsgang. Der störungsfreie Betrieb bei unseren Versuchen unterstreicht seine Funktionstüchtigkeit.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Albrechtsen, O. K.: The fibrinolytic activity of human tissues. *J. Brit. Haemat.* 3, 284, 1957
- (2) Alkjaersig, N., Fletcher, A. P. and Sherry, S.: ϵ -Aminocaproic acid: an inhibitor of plasminogen activation. *J. Biol. Chem.* 234, 832, 1959
- (3) Ambrus, J. L., Ambrus, C. M., Back, N., Sokal, J. E., Collins, G. L.: Clinical and experimental studies on the fibrinolytic enzymes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 68, 97, 1957
- (4) Ambrus, T., Markus, G.: Plasmin-Antiplasmin complex as a reservoir of fibrinolytic enzymes. *Amer. J. Physiol.* 199, 491, 1966
- (5) Astrup, T., Stage, A.: A protease inhibitor in ox lung tissue. *Acta chem. scand.* 10, 617, 1956
- (6) Astrup, T., Müllertz, St.: The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch. Biochem.* 40, 346, 1952
- (7) Astrup, T., Sterndorf, J.: Fibrinolysokinase activity in the animal and human tissue. *Acta physiol. scand.* 37, 40, 1956
- (8) Beitingner, B.: Über die fibrinolytische Aktivität von Humanplasma unter verschiedenen Lagerungsbedingungen, gemessen mit der Standardpapierfibrinolyse. *Med. Diss. München* 1973
- (9) Blatt, W. F., Segal, H., Gray, J. L., *Thromb. Diath. Haemorrhag.* 11, 393, 1973
- (10) Boehringer Mannheim GmbH, Diagnostika 1076 1713 1
- (11) Brockway, W. J., Castellino, F. J.: Measurement of the binding of antifibrinolytic amino acids to various plasminogens. *Arch. Biochem. Biophys.* 151, 194, 1972
- (12) Buchheim, N.: Standardisierung und Funktionsprüfung der teilautomatischen Standardfibrinpapier-Lysebestimmung nach Goossens. *Med. Diss. München* 1977

- (13) Claeys, H., Vermeylen, J.: Physiko-chemical and proenzyme properties of NH_2 -terminal glutamic acid and NH_2 -terminal lysine human plasminogen. Influence of 6- aminohexanoic acid. *Biochem. Biophys. Acta* 342, 351, 1974
- (14) Collen, D., De Cock, F., Verstraete, M. *Thromb. Res.* 7, 245, 1975
- (15) Copley, A. L.: Effect capillorragique de la fibrinolyse. *Arch. int. Pharmacodyn.* 99, 426, 1954
- (16) Deutsch, E.: Die endogene und exogene Auslösung der Fibrinolyse; in Hiemeyer, V.: *Therapeutische und experimentelle Fibrinolyse*. F. K. Schattauer, Stuttgart 1969, pp. 35 - 48
- (17) Dulce, H. J.: *Klinisch-chem. Diagnostik*. Urban & Schwarzenberg, München 1973, p. 18
- (18) Fearnly, G. R.: *Fibrinolysis*, Edward Arnold Publishers LTD, London, 1965, pp. 14 - 16
- (19) Goossens, N., Walcher, A.: Paper-Fibrinolysis - A new quantitative photometric fibrinolysis method. *Proc. of the IX. Congr. of the Internat. Soc. of Haematol.*, Sydney 1966
- (20) Goossens, N.: Über Fibrinolyseaktivierung in vitro und in vivo durch Nikotinsäure, Heparin und deren Mischungen. *Med. Welt*, 14, 899, 1967
- (21) Goossens N.: Standardisierte Fibrinolysebestimmung. *Med. Welt, (N. F.)*, 1816, 1970
- (22) Goossens, N.: Halbautomatische Fibrinolysebestimmung mit dem Standardfibrinpapier. Vortrag auf der Tagung der DAB in Essen am 25. 2. 77
- (23) Graeff, H., Beller, F. K.: Plasminogen Assays Using Fibrin as a Substrate; in: *Thrombosis and Bleeding Disorders. Theory and Methods* (Bang, N. U. et al. eds.). Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Academic Press, New York, London, 1971 pp. 360 - 365
- (24) Graßmann, W., Hannig, K.: Ein quantitatives Verfahren zur Analyse der Serumproteine durch Papierelektrophorese. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* 290, 1, 1952
- (25) Gross, R.: Blutgerinnung und Fibrinolyse. *Behringwerk-Mitt.* 44, 1, 1964

- (26) Hartert, H.: Die Thrombelstographie. Eine Methode zur physikalischen Analyse des Blutgerinnungsvorganges. Z. ges. exp. Med. 117, 189, 1951
- (27) Hawiger, J. et al.: Fibrinogen and FDP measurement in serum by SCT. J. Lab. Clin. Med. 75, 93, 1970
- (28) Hedner, U.: Scand. J. Haemat. 11, 398, 1973 (zitiert nach Heimburger, N.: Biochemistry of Proteinase Inhibitors from Human Plasma: A Review of Recent Development. Bayer-Symposium V "Proteinase Inhibitors", Springer-Verlag 1974, pp. 14 - 22)
- (29) Heimburger, N.: Neuere Erkenntnisse über den Mechanismus der Fibrinolyse unter besonderer Berücksichtigung der Fibrin-agar-Elektrophorese. Behringwerk-Mitt. 41, 84, 1962
- (30) Heimburger, N.: Biochemistry of Proteinase Inhibitors from Human Plasma: A Review of Recent Development, Bayer-Symposium V "Proteinase Inhibitors", Springer Verlag 1974, pp. 14 - 22
- (31) Heimburger, N.: Properties and role of antiproteases. Reprint from: Lung metabolism; Proteolysis and Antiproteolysis, Biochemical Pharmacology, Handling of Bioactive Substances, Academic Press New York, San Francisco, London, 1975, pp 3 - 24
- (32) Heimburger N., Schwick, G.: Thromb. Diath. Haemorrhag. 7, 432, 1962
- (33) Henze, K., Wallmüller, A., Bauer, M., Barth, Ch., Wolfram, G., Zöllner, N.: Serumcholesterin und Serumtriglyceride in München-Beziehungen zu Alter, Geschlecht und Körpergewicht (In Vorbereitung).
- (34) Hess, H., Goossens, N., Frost, H.: Behandlung rezidivierender Embolien in Extremitätenarterien mit Streptokinase und Urokinase. Fortschr. Med. 84, 296, 1966
- (35) Jaenecke, J.: Antikoagulantien- und Fibrinolysetherapie. Thieme-Verlag, Stuttgart, 1976, pp. 146 - 167
- (36) Kali-Chemie Pharma GmbH: Gumbix^R, Hämostyptikum, Zur Hemmung der Fibrinolyse. Wissenschaftliche Kurzinformation Sp. 5. 78 - 2000
- (37) Kaulla, K. N., von, Schultz, R. L.: Methods for the evaluation of human fibrinolysis. Amer. J. cli. Path. 29, 1041, 1958

- (38) Kline, D. L.: Interaction of streptokinase and plasminogen to form an streptokinase-plasmin activator of plasminogen. IX. Congr. Soc. Europ. haematol., Lissabon 1963
- (39) Kline, D. L., Fishman, L. B.: Proacivator function of human plasmin as shown by lysine esterase assay. J. biol. Chem. 236, 2807, 1961
- (40) Koller, F.: Fibrinolyse, Schweiz. med. Wschr. 44, 1233, 1960
- (41) Kunitz, M., Northrop, J. H.: Isolation from beef pancreas of crystalline trypsinogen, trypsin and a inhibitor trypsin compound. J. gen. Physiol. 19, 991, 1936
- (42) Lassen, M.: Heat denaturation of plasminogen in the fibrin plate method. Acta physiol. scand. 27, 371, 1952
- (43) Lerch, W.: Über die Beeinflussung der Fibrinolyse und des Hämatokrits durch Etozolin, ein neues Diuretikum an gesunden Probanden (noch nicht veröffentlicht).
- (44) Lohmann, K., Markwardt, F., Landmann, H.: Zusammenhänge zwischen Konstitution und Wirkung bei Hemmstoffen der Fibrinolyse. Thromb. Diath. haemorrhag. 10, 424, 1964
- (45) Loo, J. van de: Therapie akuter thromboembolischer Verschlüsse des arteriellen und venösen Systems; in Pezold, F. H.: Fibrinolyse-Therapie heute, Schattauer Verlag, Stuttgart-New York 1970, pp. 23 - 31
- (46) Markwardt, F.: Grundlagen und Grenzen der Anwendung von Proteaseninhibitoren als Antifibrinolytika. Sonderdruck aus "Folia Haematologica", Akademische Verlagsgesellschaft Geest & Portig, Leipzig 1967, pp. 109 - 122
- (47) Markwardt, F., Hausstein, K. O., Klöcking, H. P.: Die pharmakologische Charakterisierung des neuen Antifibrinolytikums p-Aminomethylbenzoesäure (PAMBA). Arch. int. Pharmacodyn. 152, 1 - 2, 223, 1964
- (48) Markwardt, F., Klöcking, H. P., Richter, M.: Die Kombinationswirkung von Fibrinolysehemmstoffen. Acta biol. med. germ. 12, 522, 1964
- (49) Metze, R. und Linke, P. G.: Ein Schnelltest zur Erfassung von fibrinolytischer Aktivität. Z. med. Labortechnik 13, 75, 1972

- (50) Moroi, M., Aoki, N., J. Biol. Chem. 251, 5956, 1976
- (51) Müllertz, S.: Chemistry of Fibrinolysis; Theories of plasminogen activation. Thromb. Diath. haemorrh. Suppl. 1 ad Vol. VI, 142, 1960
- (52) Müllertz, S., Clemmensen, I., Biochem. J. 159, 545, 1976
- (53) Okamoto, S.: Plasmin and antiplasmin - their pathologic physiology. Keio J. Med. 8, 211, 1959
- (54) Philipp, E.: Persönliche Mitteilung v. 12. 2. 1979
- (55) Rasche, H., Hiemeyer, V.: Theoretische und experimentelle Gesichtspunkte zur thrombolytischen Therapie mit Streptokinase; in Pezold, F. A. (ed.): Fibrinolyse-Therapie heute, Schattauer Verlag, Stuttgart - New York 1970, pp. 3 - 21
- (56) Rath, H.: Untersuchung über behandlungsspezifische Nebenwirkungen von Clofibrat und einer Kombination aus Clofibrat mit Orotsäure auf das Gerinnungs- und Fibrinolysesystem und über eine Modifikation der Standardpapierfibrinolyse nach Goossens. Med. Diss. München 1977
- (57) Sachs, L.: Angewandte Statistik, Springer-Verlag Berlin - Heidelberg - New York, 1973, pp. 422 - 426
- (58) Sherry, S.: The fibrinolytic activity of streptokinase activated plasmin. J. clin. Invest. 33, 1054. 1954
- (59) Sipos, J.: Zur Methode der Spontanpapierfibrinolyse. Med. Diss. München 1967
- (60) Spöttl, F., Constantini, R.: Die Bedeutung des Proaktivators im fibrinolytischen Fermentsystem. Thromb. Diath. haemorrh. 18, 416, 1967
- (61) Scholle, E.: Zur Methodik der Fibrinolyse-Bestimmung, speziell der Papier-Fibrinolyse. Med. Diss. München 1964
- (62) Schorer, B.: Über die Standardisierung und Vereinfachung der Spontanpapierfibrinolyse (Eluatiionsmethode). Med. Diss. München 1970
- (63) Schwick, H. G., Heimburger, N.: Biochemie der Fibrinolyse; in Hiemeyer, V.: Therapeutische und experimentelle Fibrinolyse, F. K. Schattauer Stuttgart 1969, pp. 9 - 26

- (64) Stamm, H.: Einführung in die Klinik der Fibrinolyse. S. Karger, Basel 1962, pp. 1 - 103
- (65) Thorsen, S., Kok, P., Astrup, T.: Reversible and irreversible alterations of human plasminogen indicated by changes in susceptibility of plasminogen activators and in response to ϵ -aminocaproic acid. *Thromb. Diath. Haemorrh.* 32, 325, 1974
- (66) Vinazzer, H.: Gerinnungsstörungen in der Praxis; Gustav Fischer Verlag Stuttgart 1972, pp. 18 - 20, 80
- (67) Wallén, P., Wiman, B.: On the generation of intermediate plasminogen and its significance for the activation. *Proteases and Biological Control. Cold Spring Harbor Symp. on Quant. Biol.* 291, 1975
- (68) Weber, B.: Untersuchungen über die fibrinolytische Aktivität des Plasmas gesunder Versuchspersonen mit einer Modifikation der Standardpapierfibrinolyse. *Med. Diss. München* 1975
- (69) Wenzel, E., Holzhüter, H., Muschiatti, B., Angelkort, H. G., Ochs, S., Pusztai-Markos, S., Nowak, H., Stürner, H.: Zuverlässigkeit des Fibrinogen-(Fibrin-) Spaltproduktnachweises im Plasma mit Thrombinkoagulase-, Reptilase- und Thrombin-Gerinnungszeit. *Dtsch. Med. Wschr.* 15, 746, 1974
- (70) Wiman, B., Wallén, P.: The specific interaction between plasminogen and fibrin. A physiological role of the lysine binding site in plasminogen. *Thromb. Res.* 1, 213, 1977
- (71) Witt, I.: Biochemie der Blutgerinnung und Fibrinolyse. Verlag Chemie, Weinheim 1975, pp. 103 - 120
- (72) Witte, E.: Beziehungen der Fibrinolyse zum Gerinnungsmechanismus; in Hiemeyer, V.: Therapeutische und experimentelle Fibrinolyse. F. K. Schattauer, Stuttgart 1970 pp. 64 - 74
- (73) Yamane, T.: Statistics; An Introductory Analysis. Harper & Row, New York, Evanston, London, 1969, pp. 467 - 472

- (74) Yasukouchi, T., Watanabe, T.: A new method based on one dimensional diffusion using small glass tubes for the measurement of fibrinolytic activity; I. Fibrinolytic activity of plasmin and "Euglobulin + Streptokinase". Thromb. Diath. haemorrh. 28, 329, 1972
- (75) Yasukouchi, T., Fujine, M., Kohn, S., Sakurama, S., Morioka, T., Mikami, A., Iju, M., Nakagawa, S.: A new method for the measurement of fibrinolytic activity based on one dimensional diffusion using small glass tubes; II. With special reference to the differences between the use of plasminogen-rich fibrinogen and that of plasminogen-free fibrinogen as the substrates. Thromb. and haemost. 3, 456, 1977
- (76) Zöllner, N.: Cholesterinspiegelsenkung - warum und womit? Dtsch. Ärztebl. 4, 199, 1979



LEBENS LAUF

Am 14. 9. 1948 wurde ich als Sohn des damaligen Forstassessors Heinz Thym und seiner Frau Ulla, geb. Osthold, in Karlsruhe geboren.

Nach dem Besuch der Grundschule in Herrenalb/Kreis Calw von 1954 bis 1958 wechselte ich auf das Gymnasium in Ettlingen/Baden über. Mit dem Umzug meiner Familie nach Tübingen trat ich dort 1963 in das Kepler-Gymnasium ein und bestand an dieser Schule 1968 das Abitur.

Von Januar 1969 bis Juli 1970 leistete ich den Grundwehrdienst bei der Bundeswehr als Sanitäter ab.

Die Zulassung zum Medizinstudium erhielt ich zum Wintersemester 1970/71 an der Ludwig-Maximilians-Universität in München. Hier legte ich das Vorphysikum 1972, das Physikum 1973 und das Staatsexamen 1978 ab.

Von Juni bis September 1978 arbeitete ich als Medizinalassistent an der Medizinischen Poliklinik der LMU München. Ab Oktober 1978 führte ich die experimentellen Untersuchungen zur Doktorarbeit durch.

Seit Mai 1979 bin ich im chirurgischen Teil der Medizinalassistenten-Ausbildung an der Wolfart-Klinik in Gräfelfing tätig.

